

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología Molecular

**Activación por quimioquinas de Janus quinasas y
su papel en la migración y activación de linfocitos
T por células presentadoras de antígeno**

**María Graciela Cascio Cañas
Madrid 2016**

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Activación por quimioquinas de Janus quinasas y su papel
en la migración y activación de linfocitos T por células pre-
sentadoras de antígeno**

**Licenciada en Farmacia
María Graciela Cascio Cañas**

**Director de Tesis:
Dr. José Mario Mellado García**

Madrid 2016

ÍNDICE DE CONTENIDOS

<u>I.ABREVIATURAS</u>	11
<u>II.RESUMEN</u>	21
<u>III. ABSTRACT</u>	27
<u>IV.INTRODUCCIÓN</u>	33
<u>1. El inicio de la respuesta inmune</u>	35
<u>1.1. La migración y extravasación a los órganos linfoides secundarios</u>	36
1.1.1. Cascada de adhesión leucocitaria	36
1.1.2. Migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos o <i>homing</i>	39
<u>1.2. Ganglios linfáticos (LN)</u>	40
<u>2. La sinapsis inmunológica</u>	43
<u>2.1. Formación de la sinapsis inmunológica</u>	43
<u>2.2. Estructura de la sinapsis inmunológica. SMACs</u>	47
<u>2.3. Señalización del TCR</u>	48
<u>3. Quimioquinas y sus receptores</u>	51
<u>3.1. Las quimioquinas</u>	51
3.1.1. Clasificación y estructura	51
<u>3.2. Receptores de quimioquinas</u>	52
3.2.1. Estructura y clasificación	52
3.2.2. Oligomerización de los receptores de quimioquinas	54
3.2.3. Señalización de proteínas G	54
3.2.4. Ruta Jak/Stat (<i>Janus kinase/ Signal transducer and activator of transcription</i>)	55
<u>Estructura y activación</u>	
<u>3.3. CXCR4 y su ligando CXCL12</u>	57

V. OBJETIVOS	61
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	65
1. Tampones	67
2. Medios de cultivo	67
3. Anticuerpos	67
4. Inhibidores químicos	67
4.1. Inhibidores del eje CXL12-CXCR4	67
4.2. Inhibidores de la ruta JAK/STAT	67
5. Ratones	70
5.1. Ratones C57Bl/6	70
5.2. Ratones OT2	70
5.3. Ratones cxcl12 ^{GagTm/GagTm} ;	70
6. Obtención de células primarias	70
6.1. Purificación de linfocitos T CD3 ⁺ vírgenes	71
6.2. Purificación de linfocitos T CD4 ⁺ vírgenes	71
6.3. Purificación de células dendríticas derivadas de monocitos obtenidos de médula ósea	71
7. Nucleofección de linfocitos T vírgenes	71
8. Formación de conjugados	72
8.1. Conjugados de linfocitos T CD4 ⁺ y células dendríticas	72
8.2. Conjugados de linfocitos T CD4 ⁺ y microesferas de látex	72
8.2.1. Preparado de las microesferas de látex (en condiciones estériles)	72
8.2.2. Formación de los conjugado	73
9. Citometría de flujo	73
9.1. Marcaje de proteínas extracelulares	73
9.2. Marcaje de proteínas intracelulares	73
9.2.1. Marcaje de p-Tyr	73
9.2.2. Marcaje de actina polimerizada	74
10. Inmunofluorescencia	74

11. Inmunohistoquímica	75
12. Preparación de muestras para Western Blot	75
12.1. Lisados celulares	75
12.2. Inmunoprecipitación	75
12.3. Wern blot	75
13. Aislamiento de ARN total	76
14. Síntesis de ADN complementario	76
15. PCR cuantitativa o Q-PCR	76
16. Ensayos de migración en transwell	76
17. Migración “in vivo”	77
18. Ensayos de adhesión	78
18.1. Estáticas	78
18.2. En flujo	78
18.3. Bicapas lipídicas	78
19. Ensayos de polarización de linfocitos T vírgenes	79
20. Ensayos de activación y proliferación de linfocitos T mediante formación de conjugados	79
21. Ensayo de producción de IL-2	80
22. Cinética de activación de linfocitos T vírgenes con CXCL12 o CCL21	80
23. ELISA detección RhoA activado [G-LISA® RhoA Activation Assay Biochem Kit™ (Absorbance Based)]	80
24. Ensayos de videomicroscopía	80
25. Total Internal Reflection Microscopy (TIRFM)	81
25.1. Generación de la construcción CXCR4-AcGFP	81
25.2. Bicapas lipídicas	82
25.3. Análisis	82
26. Análisis estadísticos	82

VII. RESULTADOS

85

1. Implicación de las Janus quinasas en la migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos

87

1.1. Purificación y caracterización de linfocitos T CD3⁺ vírgenes

87

1.2. Nucleofección y caracterización de los linfocitos T nucleofectados

88

1.3. Implicación de las Janus quinasas JAK1 y JAK2 en la migración a los ganglios linfáticos de los linfocitos T vírgenes

91

1.3.1. Estudio in vitro

91

1.3.2. Estudio in vivo

92

Estudio de la localización y comportamiento de los linfocitos inyectados dentro de los ganglios

1.4. Importancia de JAK1 y JAK2 en la capacidad de adhesión de los linfocitos

95

1.4.1. Estudio de adhesión en condiciones de flujo

95

1.4.2. Adhesiones estáticas

97

1.4.3. Adhesiones sobre bicapas lipídicas

98

1.5. Papel de JAK1 y JAK2 en la capacidad de polimerización de actina en los linfocitos T vírgenes

99

1.5.1. Implicación de JAK1 y JAK2 en la activación de proteínas ERM

100

1.5.2. Implicación de JAK1 y JAK2 en la capacidad de polarización celular

101

1.6. Especificidad de JAK1 y JAK2 en la ruta de activación de las integrinas desde el receptor de quimioquinas

102

2. Importancia del eje CXCR4-CXCL12 en la formación de la sinapsis inmunológica

105

2.1. Purificación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes de ratones OT2 y comprobación de su estado fenotípico

105

2.2. Caracterización de células dendríticas derivadas de monocitos extraídos de médula ósea

106

2.3. La inhibición de la señalización desencadenada por la unión de CXCL12 a su receptor CXCR4 impide la formación de la sinapsis inmunológica

107

2.3.1. Evaluación del número de sinapsis

108

2.3.2. Estudio de la duración de los contactos entre el linfocito T CD4⁺ y la célula dendrítica

110

2.4. Importancia de los GAG en la formación de la sinapsis inmunológica in vitro	112
2.5. El bloqueo de CXCR4 produce una desorganización de la estructura de sinapsis inmunológica	113
2.6. La inhibición de la señalización activada por la unión de CXCL12 a su receptor CXCR4 provoca defectos en la activación y proliferación del linfocito T	118
2.6.1. Estudio del efecto de la inhibición del eje CXCR4/CXCL12 sobre la activación del linfocito T CD4 ⁺ presente en la sinapsis inmunológica	118
2.6.2. Estudio del efecto de la inhibición del eje CXCR4/CXCL12 sobre la proliferación del linfocito T CD4 ⁺ activado en la sinapsis inmunológica	119
2.7. Ruta de señalización implicada en la activación de las integrinas desencadenada por CXCL12	120
2.7.1. Moléculas implicadas en la activación de integrinas desde el receptor de quimioquinas	121
2.8. La reducción de JAK1 y JAK2 impide la correcta formación de la sinapsis inmunológica	123
2.8.1. El número de sinapsis formadas por linfocitos T deficientes en JAK1 y JAK2 es menor	123
2.8.2. La duración de los contacto entre linfocitos T CD4 ⁺ deficientes en JAK1 y JAK2 y células dendríticas es menor	126
2.9. La reducción de JAK1 y JAK2 provoca la desorganización de la estructura de la sinapsis inmunológica	129
2.10. JAK1 y JAK2 son necesarios para una correcta activación y proliferación del linfocitos T después de la formación de la sinapsis	130

VIII. DISCUSIÓN

IX. CONCLUSIONES

X. BIBLIOGRAFÍA

XI. ANEXO I. Pies de figura de los vídeos

XII. ANEXO II. Artículos publicados durante el desarrollo de esta Tesis

I. Abreviaturas

A

- **ACRs:** receptores de quimioquinas atípicos (del inglés, *Atypical Chemokine Receptors*)
- **ADAP:** del inglés, *adhesion- and degranulation-promoting adaptor protein*
- **ADN:** ácido Dexosiribonucleico
- **ALN:** ganglios linfáticos axilares (del inglés, *Axillary Lymph Nodes*)
- **AP-2:** del inglés, *Adaptin-2*
- **APC:** alofococianina (del inglés, *Allophycocyanin*)
- **APC:** célula presentadora de antígeno (del inglés, *Antigen Presenting Cell*)
- **ARN:** Ácido Ribonucleico
- **ARNip:** Ácido Ribonucleico pequeño de interferencia
- **ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero.
- **Arp2/3:** del inglés, *Actin-Related Proteins*

B

- **BCR:** receptor de células B (del inglés, *B Cell Receptor*)
- **BRET:** bioluminiscencia de transferencia de energía por resonancia (del inglés, *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*)
- **BSA:** albúmina de suero bovino (del inglés, *Bovine Serum Albumin*)

C

- **CD_:** cúmulo de diferenciación (del inglés, *Cluster of Differentiation*)
- **Cdc42:** del inglés, *Cell division control protein 42*
- **Células NK:** del inglés, *Natural Killer*
- **cSMAC:** SMAC central

D

- **DAG:** diacilglicerol
- **DC-SIGN:** del inglés, *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*
- **DCs:** células dendríticas (del inglés, *Dendritic Cells*)
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **DOPC:** 1,2-dioleoyl-fosfatidil-colina (del inglés, *1,2-dioleoyl-PhosphoCholine*)
- **dSMAC:** SMAC distal

E

- **ECL:** bucle extracelular (del inglés, *Extracellular Loop*)
- **ECL:** del inglés, *Enhanced Chemiluminescence*
- **EDTA:** ácido etildiaminotetraacético (del inglés, *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- **ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
- **ERM:** Ezrina, Radixina y Moesina
- **ESAM:** del inglés, *Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule*

F

- **FACS:** citometría de flujo (del inglés, *Fluorescence-activated cell sorting*)
- **FBS:** suero fetal bovino (del inglés, *Fetal Bovine Serum*)
- **FDCs:** células dendríticas foliculares (del inglés, *Follicular Dendritic Cells*)
- **FERM domain:** del inglés, *4.1 protein, Ezrin, Radixin and Moesin*
- **FITC:** isotiocianato de fluoresceína (del inglés, *Fluorescein Isothiocyanate*)
- **FRCs:** células fibroblásticas reticulares (del inglés, *Fibroblastic Reticular Cells*)
- **FRET:** transferencia de energía entre fluorocromos (del inglés, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

G

- **GAG:** glicosaminoglicano
- **GAPs:** proteínas activadoras de la actividad GTPasa (del inglés, *GTPase-Activating Protein*)
- **GDP:** guanosín difosfato (del inglés, *Guanosine diphosphate*)
- **GEF:** del inglés, *Guanine nucleotide Exchange Factor*
- **GFP:** proteína verde fluorescente (del inglés, *green fluorescent protein*)
- **GLYCAM1:** molécula de adherencia celular dependiente de la glucosilación 1 (del inglés, *Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1*)
- **GPCRs:** receptores acoplados a proteínas G (del inglés, *G Protein-Coupled Receptors*)
- **GPI:** glicosil-fosfatidil-inositol (del inglés, *Glycosylphosphatidylinositol*)
- **Grb2:** del inglés, *Growth factor receptor-bound protein 2*
- **GRKs:** quinasas de receptores acoplados a proteínas G (del inglés, *G protein-coupled Receptor Kinases*)
- **GTP:** guanosín trifosfato (del inglés, *Guanosine Triphosphate*)

H

- **HEVs:** vénulas de endotelio alto (del inglés, *High Endothelial Venules*)
- **HS1:** del inglés, *Hematopoietic actin regulatory protein hematopoietic lineage cell-Specific protein 1*

I

- **ICAM₁**: moléculas de adhesión intracelular 1 (del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule*)
- **ICL**: bucle intracelular (del inglés, *Intracellular Loop*)
- **IF**: inmunofluorescencia
- **Ig**: inmunoglobulina
- **IL-_x**: interleuquina _x
- **IMF**: Intensidad Media de Fluorescencia
- **INL**: ganglios linfáticos inguinales (del inglés, *Inguinal Lymph Nodes*)
- **IP**: inmunoprecipitación
- **IP₃**: inositol 3,4,5-trifosfato (del inglés, *Inositol 3,4,5-trisphosphate*)
- **IRM**: del inglés, *Interference Reflection Microscopy*
- **IS**: sinapsis inmunológica (del inglés, *Immune Synapses*)
- **ITAM**: del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*
- **I κ k**: del inglés, *IL2-inducible T-cell kinase*

J

- **JAK**: del inglés, *Just Another Kinase*
- **JAM-_x**: del inglés, *Junctional Adhesion Molecule*
- **JH**: del inglés, *JAK Homology*

L

- **LAT**: del inglés, *Linker of Activated T cells*
- **Lck**: proteína tirosina quinasa específica de leucocitos (del inglés, *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*)
- **LFA-_x**: antígeno leucocítico funcional (del inglés, *Lymphocyte Function associated Antigen*)
- **LN**: ganglio linfático o nódulo linfático (del inglés, *Lymph Node*)
- **LPS**: lipopolisacárido

M

- **Mac-1**: integrina de macrófagos (del inglés, *Macrophage Integrin*)
- **MALT**: tejido linfoide asociado a mucosas (del inglés, *Mucosa-associated lymphoid tissue*)
- **MAPK**: proteínas quinasas activadas por mitógenos (del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*)
- **MHC-_x**: complejo mayor de histocompatibilidad de clase (del inglés, *Major Histocompatibility Complex Class _x*)
- **MLCK**: quinasa miosina de cadena ligera (del inglés, *Myosin Light-Chain Kinase*)
- **MLN**: ganglios linfáticos mesentéricos (del inglés, *Mesenteric Lymph Nodes*)
- **MTOC**: centro organizador de microtúbulos (del inglés, *Microtubule-Organizing Center*)

N

- **Nck**: del inglés, *Non-Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein*
- **NPF**: del inglés, *Nucleation Promoting Factor*

P

- **PBS**: tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate-Buffered Saline*)
- **PE**: ficoeritrina (del inglés, *Phytoerythrin*)
- **PECAM1**: del inglés, *Platelet Endothelial-Cell Adhesion Molecule 1*
- **PFA**: paraformaldehído
- **PI3K**: fosfoinositol 3-quinasa (del inglés, *PhosphoInositide 3-kinase*)
- **PIAS**: del inglés, *Protein Inhibitor of Activated STAT*
- **PIP₂**: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (del inglés, *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)
- **PIP5K1C**: fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa, tipo I, γ (del inglés, *Phosphatidylinositol-4-Phosphate 5-Kinase, type I, γ*)
- **PKC**: proteína quinasa C (del inglés, *Protein Kinasa C*)
- **PKD1**: proteína quinasa D1 (del inglés, *Protein Kinasa D1*)
- **PLC γ 1**: fosfolipasa C γ 1 (del inglés, *Phospholipase C γ 1*)
- **PLD1**: fosfolipasa D 1 (del inglés, *Phospholipase D1*)
- **PLN**: ganglios poplíteos (del inglés, *Popliteal Lymph Nodes*)
- **PMSF**: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés, *PhenylMethaneSulfonyl Fluoride o Phenyl-MethylSulfonyl Fluoride*)
- **PSGL-1**: ligando de la P-selectina glicoproteína 1 (del inglés, *P-selectin Glycoprotein Ligand-1*)
- **pSMAC**: SMAC periférico
- **PTx**: toxina pertúsica (del inglés, *Pertussis Toxin*)
- **pTyr**: fosfo tirosina (del inglés, *phospho Tyrosin*)

Q

- **Q-PCR**: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (del inglés, *Real-time Polymerase Chain Reaction*)

R

- **Rac1**: del inglés, *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
- **RALP**: del inglés, *Regulator of cell Adhesion and Polarization enriched in Lymphoid tissues*
- **Rap1**: del inglés, *Ras-proximate-1*
- **Ratones plt**: ratones deficientes en CCL21 y CCL19 en los órganos linfoides secundarios (del inglés, *paucity of lymph node T cells*)
- **RGS**: reguladores de la señalización de la proteína G (del inglés, *Regulator of G protein Signaling*)
- **RIAM**: del inglés, *Rap1-GTP-interacting adaptor molecule*
- **rpm**: revoluciones por minuto

S

- **SDF-1 α** : factor derivado de estroma (del inglés, *Stromal cell-Derived Factor*)
- **SHP**: del inglés, *SH2-containing protein tyrosine phosphatase*
- **Síndrome de WHIM**: del inglés, *Warts, Hypogammaglobulinemia, Immunodeficiency, and Myelokathexis syndrome*
- **SKAP55**: del inglés, *Src kinase-associated phosphoprotein 55kDa*
- **SLP76**: del inglés, *Lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)*
- **SMACs**: del inglés, *Supra Molecular Activation Clusters*
- **SOCS**: supresoras de la señalización por citoquinas (del inglés, *Supresor of Cytokine Signaling*)
- **Src 2 (SH2)**: del inglés, *Src homology 2*
- **STAT**: del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription*

T

- **TBS**: tampón tris salino (del inglés, *Tris-Buffered Saline*)
- **T_{CM}**: linfocitos T CD8⁺ de memoria central (del inglés, *Central Memory CD8⁺ T cells*)
- **TCR**: receptor de células T (del inglés, *T Cell Receptor*)
- **TEM**: migración transendotelial (del inglés, *Transendothelial Migration*)
- **TIRFM**: microscopio de fluorescencia por reflexión total interna (del inglés, *Total Internal Reflection Microscopy*)
- **TM**: transmembrana
- **Tyk2**: tirosina quinasa 2 (del inglés, *Tyrosine Kinase 2*)

U

- **u. a.**: unidades arbitrarias

V

- **VCAM-1**: molécula de citoadhesión vascular-1 (del inglés, *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*)
- **VE-cadherin**: cadherina presente en el endotelio vascular (del inglés, *Vascular Endothelial-cadherin*)
- **VIH-1**: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- **VLA-4**: antígenos de activación muy tardía (del inglés, *Very Late Antigen-4*)
- **VVOs**: del inglés, *Vesiculo-Vacuolar Organelles*

W

- **WASp**: del inglés, *Wiskott–Aldrich Syndrome protein*
- **WAVE2**: del inglés, *WASP-family verprolin-homologous protein-1*
- **WB**: inmunoblot (del inglés, *Western Blot*)

Z

- **Zap70:** del inglés, *Zeta-chain-Associated Protein kinase 70*

II. Resumen

Las Janus quinasas son tirosina quinasas que tienen un papel clave en la señalización intracelular derivada de la activación de los receptores de citoquinas, pero también participan en la señalización desencadenada tras la activación de los receptores de quimioquinas. Las quimioquinas son proteínas de bajo peso molecular que actúan como factores quimioatrayentes y participan en multitud de procesos fisiológicos y patológicos, como por ejemplo, en la migración de los linfocitos T vírgenes a los ganglios linfáticos.

Empleando linfocitos T vírgenes purificados en los que se redujo la expresión de las Janus quinasas JAK1 y JAK2, estudiamos la implicación de estas dos quinasas en la ruta de señalización desencadenada tras la activación de los receptores de quimioquinas CXCR4 y CCR7 por sus ligandos CXCL12 y CCL21 respectivamente.

Los linfocitos T deficientes en JAK1 y JAK2 mostraron una menor capacidad de migración “in vitro” en respuesta a CXCL12 y CCL21. El uso de microscopía intravital nos permitió observar que “in vivo” también presentaban un defecto en su capacidad para llegar a los ganglios linfáticos (*homing*).

JAK1 y JAK2 juegan un papel clave en la activación de las integrinas desde los receptores de quimioquinas, de hecho, en experimentos de adhesión sobre ICAM-1 y VCAM-1 se aprecia una disminución en la capacidad de adhesión de los linfocitos T deficientes en JAK1 y JAK2 en respuesta a CXCL12 y CCL21. Además, también participan en la polimerización de actina y en la activación de las proteínas ezrina, radixin y moesina (ERM) promovida por quimioquinas.

Por otro lado, el receptor CXCR4 está presente en la sinapsis inmunológica, situándose en el anillo periférico, pSMAC. Su activación por CXCL12 unido a los glicosaminoglicanos sobre la célula dendrítica contribuye a la activación de las integrinas, y por lo tanto a estabilizar el conjugado entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito T.

En el mecanismo molecular implicado participan dos rutas complementarias, por un lado la proteína Gi y la posterior activación de RhoA, y por otro lado, las quinasas JAK1 y JAK2 que vía Vav-1 y RhoA también conectan CXCR4 con las integrinas.

El bloqueo de dicha señalización o la reducción de la expresión de JAK1 y JAK2 provocan defectos en la estructura de la sinapsis, que se traducen en una menor capacidad de activación y proliferación del linfocito T.

III. Abstract

Janus kinases are a very important tyrosine kinase family in the cytokine signaling pathway, which also participates in the chemokine signaling pathway. Chemokines are low weight molecular proteins which provide directional cues for cells and participate in multiple physiological and pathological processes such as naïve T cells homing.

Using purified JAK1 and JAK2 deficient naïve T cells we studied the role of these kinases in the CXCR4 and CCR7 signaling pathway triggered by their ligands CXCL12 and CCL21, respectively.

JAK1 and JAK2 deficient T cells showed a defect in migration towards CXCL12 and CCL21 “in vitro”. Moreover, a defect in homing was observed using two-photon microscopy.

JAK1 and JAK2 play an essential role in integrin activation triggered by chemokine receptors. In fact, the adhesion capacity of JAK1 and JAK2 deficient T cells triggered by CXCL12 and CCL21 is diminished in adhesion experiments using plates coated with ICAM-1 and VCAM-1. Furthermore, JAK1 and JAK2 also participate in actin polymerization and ERM proteins activation promoted by chemokines.

On the other hand, the CXCR4 receptor is present in the peripheral ring of the immunological synapse (pSMAC) and its activation by CXCL12 together with the glycosaminoglycans present on the dendritic cell surface contribute to integrins activation, hence, improving the binding between the antigen presenting cell and the T cell.

This molecular mechanism involves two complementary pathways: the Gi protein pathway triggering the activation of RhoA; and JAK1 and JAK2 which connect CXCR4 with integrins via Vav-1 and RhoA.

Either the blockage of this pathway or the knock-down of JAK1 and JAK2 cause defects in the structure of the immunological synapse leading to a deficiency in the activation and proliferation of the T cell.

IV. Introducción

1. El inicio de la respuesta inmunitaria

El cuerpo humano ante una agresión se defiende identificando al agente patógeno y generando distintas respuestas dirigidas a eliminarlo. Esta función es ejecutada por el sistema inmunitario mediante el desarrollo de dos tipos de respuestas, una primera, rápida e inespecífica conocida como respuesta inmunitaria innata y otra específica, más lenta con capacidad para generar memoria que asegura una respuesta más rápida y eficaz frente a posibles recidivas de la enfermedad, conocida como respuesta inmunitaria adquirida.

La respuesta innata se basa en la capacidad fagocítica de las células que participan en ella, mientras que la respuesta adquirida basa su respuesta en la especificidad de los linfocitos T y B. Estos, poseen mecanismos genéticos que les permiten desarrollar una gran diversidad de receptores específicos de antígeno, en el caso de los linfocitos B se denominan BCR (Surova et al. 2014) y en el caso de los linfocitos T, TCR (Love et al. 2011). Ambos tipos celulares se originan y completan su desarrollo en los órganos linfoides primarios o centrales, la médula ósea y el timo. Así, la formación de estas células comienza en la médula ósea a partir de células hematopoyéticas pluripotenciales, pero, mientras que los linfocitos B completarán su desarrollo sin salir de esta localización, los precursores de linfocitos T migrarán por el torrente sanguíneo hasta el timo, un órgano situado en la parte alta del tórax. Allí, y siguiendo un movimiento a favor de gradientes quimiotácticos (CXCL12, CCL21, CCL19 y CCL25) los linfocitos T completarán su diferenciación (Love et al. 2011, Griffith et al. 2014).

Dada la gran diversidad de receptores de antígeno que el proceso de reordenamiento genético puede generar, un paso importante antes de que los linfocitos salgan a la circulación, es comprobar su especificidad para asegurar que serán capaces de efectuar correctamente su función. De esta manera los linfocitos durante su desarrollo sufrirán primero un proceso de selección positiva que asegura que los linfocitos que maduren sean funcionales. En el caso de los linfocitos T este paso permite seleccionar a las células que son capaces de reconocer péptidos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (Allman et al. 2008, Krogsgaard 2014, Takada et al. 2015). Además, los linfocitos con receptores fuertemente reactivos ante antígenos propios, serán eliminados para evitar reacciones autorreactivas. Este paso se conoce como selección negativa y es responsable de inducir tolerancia ante antígenos propios (Santori 2015).

Los linfocitos que completan su desarrollo, denominados linfocitos T y B vírgenes (*naïve*, no han estado nunca en contacto con un antígeno), salen a circulación y recirculan constantemente en el torrente sanguíneo extravasándose a los órganos linfoides secundarios, bazo, ganglios linfáticos o tejido

linfoide asociado a las mucosas (MALT), de donde volverán a la circulación de nuevo.

Los antígenos por su parte también alcanzan los órganos linfoides secundarios a través de la circulación sanguínea y de la linfática, bien en forma soluble o transportados por células presentadoras de antígeno (APC) que los captan en los tejidos y tras procesarlos los presentan en su superficie a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) o de clase II (MHC II). De este modo se facilita el encuentro de los linfocitos con los antígenos aumentando la eficiencia de la respuesta inmune.

El encuentro de una APC que presenta un antígeno con un linfocito T cuyo TCR es específico de este antígeno, origina una unión estable y la formación de una estructura denominada sinapsis inmunológica (IS). Es el origen de la activación de los linfocitos, que continua con su expansión clonal y que finalmente dará lugar a una amplia descendencia de células con idéntica especificidad de antígeno (selección clonal).

Las células activadas y con capacidad efectora salen de los órganos linfoides secundarios guiadas por las señales inflamatorias y quimioatrayentes para infiltrarse en los tejidos donde se ha producido la infección. La mayor parte de estas células efectoras mueren después de eliminar al agente patógeno, pero algunas se mantienen con el fin de generar células de memoria que protegerán a nuestro organismo durante mucho tiempo frente a posteriores infecciones causadas por el mismo patógeno.

1.1. La migración y extravasación a los órganos linfoides secundarios

La migración y entrada de los linfocitos vírgenes en los órganos linfoides secundarios se denomina *homing* y se produce a través de la microvasculatura que irriga estos órganos. Esta extravasación celular es similar a la que ocurre en los tejidos inflamados y resulta un punto clave en el correcto desarrollo de la respuesta inmunitaria. Se produce en varios pasos que se suceden y superponen y que en conjunto se denominan cascada de extravasación leucocitaria (Butcher 1991) (**Fig. 1**).

1.1.1. Cascada de adhesión leucocitaria

Aunque originalmente se describieron tres etapas [rodamiento, adhesión y extravasación (Butcher 1991)] hoy sabemos que pueden distinguirse además, otros pasos (Ley et al. 2007, Nourshargh et al. 2014):

1. **Captura o *tethering***: el proceso comienza con pequeños contactos del leucocito que arrastra el torrente sanguíneo con las paredes de las células endoteliales que forman el vaso sanguíneo.
2. **Rodamiento o *rolling***: esta etapa está mediada por la interacción de la L-selectina (CD62L), situada en los leucocitos, y la P-selectina y la E-selectina situadas en la superficie de las células endoteliales, con sus ligandos, glicoproteínas presentes en la membrana de la célula endotelial o del propio leucocito, como por ejemplo el ligando de la P-selectina glicoproteína 1 (PSGL-1) (Alon et al. 2007). De esta manera el leucocito capturado empieza a rodar sobre el endotelio vascular (**Fig. 1A**).
3. **Parada o *arrest y adhesión o spreading***: se produce un aumento de la superficie de

contacto entre el leucocito y la célula endotelial, permitiendo el acceso de la célula inmunitaria a otras moléculas expresadas sobre la superficie endotelial. Moléculas como las quimioquinas juegan un papel clave, ya que promueven la activación desde el interior celular (mecanismo *inside-out*) de las integrinas. Así, moléculas como LFA-1 y VLA-4 entre otras, son capaces de reconocer sus ligandos (ICAM-1 y VCAM-1, respectivamente) en la superficie endotelial. Las integrinas activadas además, formarán pequeñas agrupaciones o microagregados, generando una fuerte adhesión del leucocito sobre la célula endotelial (Dixit et al. 2012); e inician la señalización hacia el interior celular (mecanismo *outside-in*) que mediante su unión a través de su cola citoplasmática a la talina-1 y kindlin-3 conectará con el citoesqueleto de actina (Mosser et al. 2009, Lefort et al. 2012) (**Fig. 1B**).

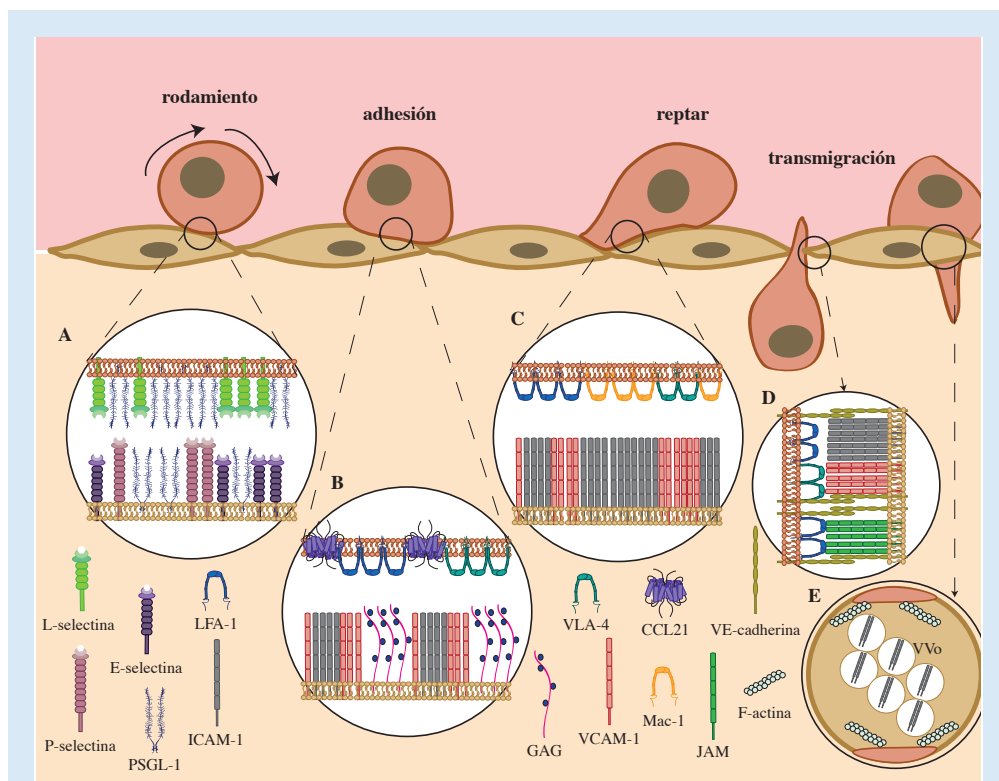


Figura 1. Cascada de extravasación leucocitaria. La figura muestra las distintas etapas por las que pasa el leucocito para salir del torrente sanguíneo y las moléculas que participan en cada una de ellas. (A) **Captura y rodamiento.** El leucocito entra en contacto con el endotelio y comienza a rodar por su superficie. (B) **Parada y adhesión.** Se produce una adhesión firme del leucocito al endotelio vascular. (C) **Reptar.** El leucocito emite protrusiones en busca de factores quimioatrayentes para comenzar la etapa de trans migración que podrá realizar de dos maneras distintas. (D) **Paracelular.** El leucocito atraviesa el endotelio vascular pasando entre dos células endoteliales. (E) **Transcelular.** En este caso el leucocito pasa a través de una célula endotelial.

4. **Reptar o crawling:** con toda esta maquinaria preparada el leucocito está listo para atravesar endotelio vascular. Durante esta fase el leucocito emite protrusiones cuya adhesión depende de las integrinas LFA-1 y Mac-1, permitiendo un óptimo escaneo de la superficie de la célula endotelial opuesta al lumen del vaso en busca de gradientes quimioatrayentes. La célula endotelial por su parte genera la formación de

proyecciones ricas en ICAM-1 y VCAM-1 que permitirán el inicio de la migración del leucocito de manera paracelular o transcelular. El *crawling* es un paso esencial para que se produzca la migración transendotelial (TEM) y su bloqueo disminuye significativamente la capacidad de los leucocitos para atravesar el endotelio vascular (Sumagin et al. 2010) (**Fig. 1C**).

5. **Migración transendotelial:** es la fase que finalizará con el leucocito fuera del torrente sanguíneo. Puede llevarse a cabo de dos maneras:

- **Paracelular:** el leucocito atravesará entre dos células endoteliales y para ello es necesario que se debiliten las uniones que existen entre ellas. La integrina LFA-1 presente en el leucocito se unirá a los dímeros de ICAM-1 de las células endoteliales, favoreciendo su agrupación, lo que provoca la fosforilación y activación de la cortactina, que desencadena la polimerización y reestructuración del citoesqueleto de actina, aumentando la formación de agregados de moléculas de ICAM-1 en las zonas cercanas a las uniones entre las células endoteliales (Vestweber 2015). Este proceso permite la activación de RhoA y la liberación de Ca^{2+} intracelular en las células endoteliales. De manera paralela la unión de VLA-4 en el leucocito con las moléculas de VCAM-1 presentes en las células endoteliales desencadena su agregación, la activación de Rac1, la liberación de Ca^{2+} intracelular, así como la activación de la proteína quinasa C (PKC). Todo este proceso provoca la fosforilación de la VE-cadherina, debilitando las uniones entre las células endoteliales, a la vez que se produce la activación de la quinasa miosina de cadena ligera (MLCK) que induce tensión en estas células (Muller 2011). Además, algunas moléculas que forman parte de las uniones entre las células endoteliales tienen ligandos en la superficie del leucocito, facilitando así su paso a través de las células endoteliales. Entre ellos se encuentran algunos miembros de la superfamilia de la inmunoglobulinas como PECAM1, ICAM1, ICAM2, JAM-A, JAM-B y JAM-C, y ESAM o CD99 (Schnoor et al. 2015) (**Fig. 1D**).
- **Transcelular:** tiene lugar en las zonas más finas del endotelio para facilitar la extravasación leucocitaria. Este tipo de migración representa un porcentaje pequeño del total y comienza con la emisión de protrusiones por parte del leucocito hacia la célula endotelial. La unión de ICAM-1, presente en las células endoteliales, a las integrinas permite la translocación del mismo a zonas ricas en caveolas y actina, formándose una estructura en forma de racimo de uvas, compuestas por una agrupación de vesículas y vacuolas (VVOs), que forman canales intracelulares a través de los cuales migran los leucocitos (Filippi 2016). Las proteínas ezrina, radixina y moesina (ERM) pueden actuar como conectores de ICAM-1 con proteínas del citoesqueleto como actina y vimentina, que se colocarán alrededor de estos canales colaborando en el mantenimiento de la estructura (Ley et al. 2007) (**Fig. 1E**).

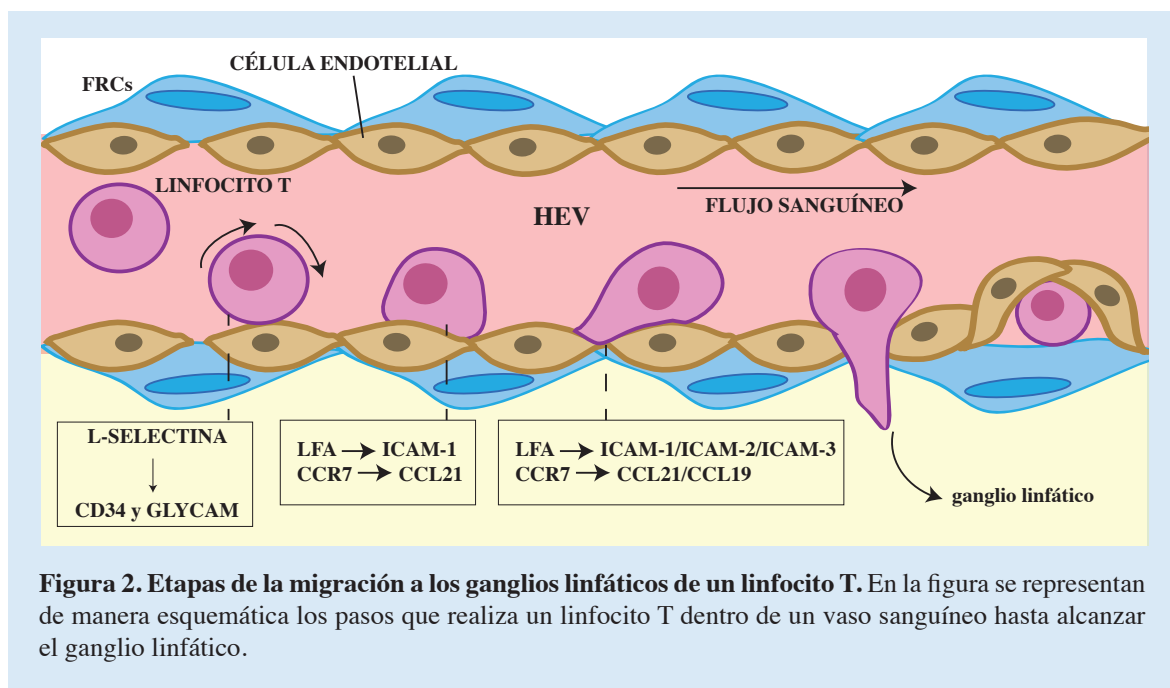
1.1.2. Migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos o *homing*

La migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos, al igual que la entrada a las Placas de Peyer (un tipo de MALT) se produce mediante la cascada de extravasación a través de las vénulas de endotelio alto (HEVs), que son vénulas poscapilares especializadas. No será así en el caso del bazo ya que no posee este tipo de vasos sanguíneos (Comerford et al. 2013, Arnon et al. 2014).

Las HEV, no son simples ventanas de conexión entre la sangre y los ganglios linfáticos, también tienen un papel activo en el mantenimiento de la homeostasis de los ganglios, controlando activamente el número de linfocitos que entran en los mismos (Mionnet et al. 2011, Chang et al. 2015).

En este caso concreto el rodamiento del linfocito sobre la superficie de las células endoteliales vendrá determinado por la interacción entre la L-selectina, presente en la superficie de los linfocitos, con CD34 y GLYCAM (Girard et al. 2012), dos mucinoides llamados adreínas vasculares y que se sitúan en las paredes de las HEVs. De este modo el linfocito disminuye su velocidad en el torrente sanguíneo, aumentando su superficie de contacto con las paredes del endotelio, lo que facilita su adhesión (Mitoma et al. 2007). En esta fase, se produce la activación de la integrina LFA-1 por un mecanismo *inside-out*, es decir desde dentro de la célula. La quimioquina CCL21 es producida por las células endoteliales de las HEVs (Miyasaka et al. 2004) y retenida en la superficie de las mismas por el heparán sulfato (Girard et al. 2012), lo que permitirá la asociación con su receptor CCR7 (Bao et al. 2010, Masopust et al. 2013), presente en la superficie del linfocito y con ello la activación de LFA-1. Esta activación incentiva la unión de las integrinas a sus ligandos ICAM-1 y ICAM-2, y su posterior agregación, aumentando su afección y desencadenando la activación de la señalización de la integrina *outside-in*, permitiendo una adhesión más firme. Por otro lado, la quimioquina CCL19 es producida por las células estromales cercanas a las HEVs y transportada a la superficie de las células endoteliales (Baekkevold et al. 2001) contribuyendo también a la activación de las integrinas tras unirse a CCR7 (Berlin-Rufenach et al. 1999, Park et al. 2010) (**Fig. 2**). De estos datos se deduce la importancia del eje CCL19/CCL21/CCR7 en todo este proceso, de hecho los ratones deficientes en CCR7 presentan alteraciones en la arquitectura de los órganos linfoides secundarios (Forster et al. 2016) y una reducción en el número de linfocitos T y de células dendríticas; algo similar a lo que ocurre en los ratones deficientes en CCL21 y CCL19 (ratones *plt/plt*) (Mori et al. 2001). Recientemente, se ha observado que este fenómeno es debido sólo a la ausencia de CCL21, puesto que el ratón CCL19^{-/-} no presenta alteraciones en el número de linfocitos T y células dendríticas presentes en los órganos linfoides secundarios (Comerford et al. 2013).

Todo este proceso termina con la extravasación del linfocito T a favor del gradiente quimioatractivo al interior del ganglio linfático.



1.2. Ganglios linfáticos (LN)

Los ganglios linfáticos son órganos encapsulados, pertenecientes al grupo de los órganos linfoides secundarios y que se localizan en los puntos de convergencia de los vasos del sistema linfático. Este sistema se encarga de transportar la linfa, líquido que se produce de manera continua por filtración de la sangre y que transporta agentes patógenos y células cargadas con antígeno desde tejidos infectados hacia los propios ganglios linfáticos.

Se trata de órganos muy compartimentalizados, poseen distintos nichos o zonas especializadas en la contención de determinados tipos celulares que son organizados en función de distintos gradientes quimioatrayentes. Podemos distinguir entre tres zonas principales (**Fig. 3**):

- **Paracórtex o zona T:** está formada por una matriz extracelular revestida con células fibroblásticas reticulares (FRCs). Estas células son miofibroblastos de origen mesenquimal, inmunológicamente especializados (Fletcher et al. 2015). Son productoras de citoquinas, como la interleuquina 7 (IL-7), necesaria para la supervivencia de los linfocitos T indiferenciados, y de quimioquinas como CCL19, CCL21 y CXCL12 (Bajenoff et al. 2006, Link et al. 2007). Las HEV desembocan en esta zona, de manera que una vez que los linfocitos T entran al ganglio, por el mecanismo explicado, quedan aquí retenidos gracias a la activación de CCR7 y de CXCR4, presentes en su superficie, y al gradiente quimiotáctico formado por sus ligandos y que será el último responsable del movimiento de los linfocitos en esta zona (Worbs et al. 2007). Los linfocitos B serán excluidos de esta zona y pasarán a los folículos siguiendo gradientes quimiotácticos de otra quimioquina, CXCL13, como referiremos más adelante. En esta zona también se concentran las células dendríticas (DCs), que son células presentadoras de antígeno, que migran también al ganglio bajo la influencia del gradiente CCL21 presente en esta zona y acceden a los ganglios a través de los vasos linfáticos aferentes, aunque una pequeña parte de ellas puede acceder también a través de las HEV (Cavanagh et al. 2002).

- Además, hay células dendríticas residentes en los ganglios, que se sitúan en los alrededores de las HEV y cuyas dendritas tienen un movimiento continuo que les permite captar antígenos solubles en la sangre (Alvarez et al. 2008). La red formada por las FRCs constituye el entramado necesario para la correcta organización de esta región, además, facilitan el movimiento de los linfocitos T en la búsqueda de su antígeno específico (Brown et al. 2015), y favorecen la formación de la sinapsis inmunológica y el comienzo de la inmunidad adquirida.
- **Córtex:** En esta zona se sitúan los folículos o zonas B. Los linfocitos B vírgenes expresan en su superficie CXCR5, CCR7 e EBI2 y van a entrar al ganglio, al igual que los linfocitos T, a través de las HEV, pero migran hacia el folículo linfoide bajo la influencia de CXCR5 que se unirá a la quimioquina CXCL13, secretada por las células dendríticas foliculares (FDCs) y las células estromales presentes en los folículos (Cyster et al. 2000, Katakai et al. 2008, Mueller et al. 2009). Una vez en los folículos los linfocitos B están en continuo movimiento para captar antígeno y activarse. La activación conlleva el aumento de los niveles de CCR7 e EBI2 que frena la señalización por CXCR5 (Barroso et al. 2012), e inicia su migración hacia el borde de la zona B con la zona T, en respuesta al gradiente CCL19/CCL21 producido por las células fibroblásticas reticulares situadas en la zona T (Reif et al. 2002). Aquí entrarán en contacto con los linfocitos T colaboradores (o linfocitos T *helper*), y el linfocito B se activará vía CD40, originando células plasmáticas, que son células B con alta capacidad productora de anticuerpos, o células B de memoria.
 - **Médula:** En esta zona se sitúan los vasos linfáticos eferentes, que permiten la salida de linfocitos en un proceso que requiere la presencia del receptor S1PR1 y de su ligando S1P (Cyster et al. 2012).

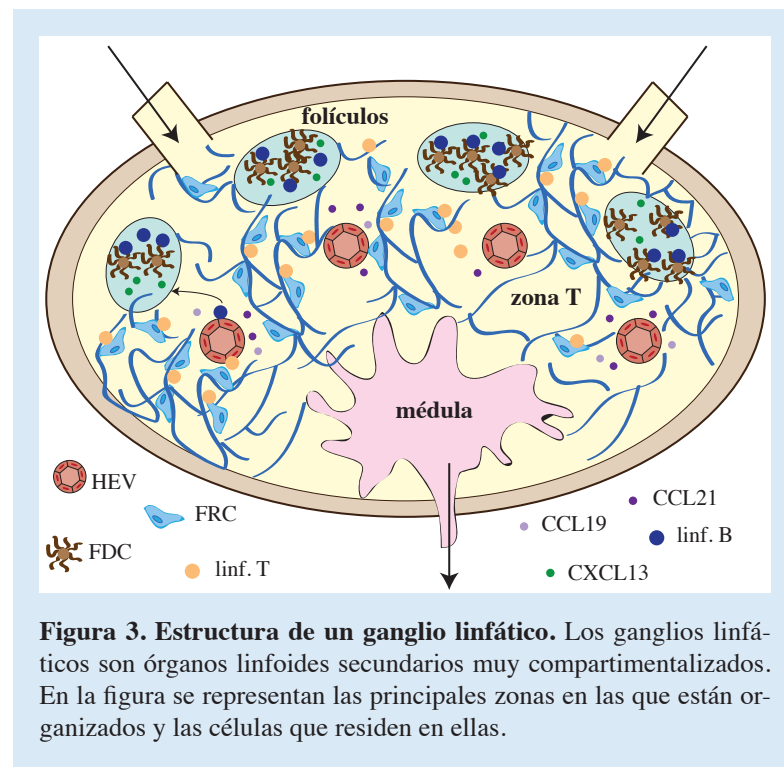


Figura 3. Estructura de un ganglio linfático. Los ganglios linfáticos son órganos linfoides secundarios muy compartimentalizados. En la figura se representan las principales zonas en las que están organizados y las células que residen en ellas.

2. La sinapsis inmunológica

Los linfocitos T y B en los ganglios linfáticos se activan al entrar en contacto con su antígeno específico, dando así inicio a la respuesta específica frente al patógeno. Estos antígenos llegan a los ganglios en forma soluble a través de la sangre y la linfa, o son procesados y presentados por las APC. El continuo movimiento de las APC y los linfocitos dentro del ganglio favorecen los contactos entre células y el reconocimiento por parte del TCR, en los linfocitos T o del BCR en los linfocitos B, de su antígeno específico, dando lugar a una estructura estable conocida como sinapsis inmunológica.

El término sinapsis inmunológica se usó por primera vez en 1994 (Paul et al. 1994) y tiene su origen en la similitud que existe entre el proceso de reconocimiento de antígenos específicos por los linfocitos y la comunicación que tiene lugar entre dos células del sistema nervioso (Norcross 1984).

La definición de sinapsis inmunológica ha ido evolucionando y precisándose al mismo tiempo que avanzaban las técnicas que permitían su estudio. Hoy en día se define como el área celular donde se produce un contacto estable y específico, entre un linfocito y una célula presentadora de antígeno (Dustin et al. 1998, Dustin 2009, Rodríguez-Fernández et al. 2010).

Pueden distinguirse distintos tipos de sinapsis en función de las células que intervienen, por ejemplo, las sinapsis que se forman entre linfocitos T o B y los diferentes tipos celulares que pueden actuar como APC, o entre los linfocitos citotóxicos o células *Natural Killer* (NK) y sus dianas. En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de una sinapsis formada por un linfocito T CD4⁺ y una célula dendrítica como célula presentadora de antígeno.

2.1. Formación de la sinapsis inmunológica

1. Búsqueda del antígeno específico

Los linfocitos T vírgenes entran a los ganglios linfáticos a través de las HEV y se sitúan en la zona T dirigidos por dos quimioquinas CCL19 y CCL21. Allí comienzan la búsqueda de su antígeno específico, que será aquel reconocido por su TCR.

Los linfocitos T vírgenes se mueven rápida y aleatoriamente (Miller et al. 2004b) evaluando a los antígenos presentados por las células dendríticas presentes en el paracórtex. Este proceso se ve favorecido por el propio movimiento de las células dendríticas, un movimiento más lento,

pero que implica la formación de prolongaciones, que facilitan el contacto con los linfocitos T y aumenta la superficie de contacto (Miller et al. 2004a).

La distancia entre las células para que se pueda producir una sinapsis inmunológica tiene que ser menor de 15nm, de manera que una aproximación de las dos células mediante moléculas de adhesión, supone el primer punto que promueve la polimerización de actina, y origina proyecciones o prolongaciones invasivas en el linfocito que facilitan el contacto (Kumari et al. 2014).

Ese primer contacto permite la redistribución de moléculas de adhesión como ICAM-3 en la superficie tanto del linfocito como de la célula dendrítica. Su posterior unión con su receptor, la integrina LFA-1 y con DC-SIGN, confiere la fuerza necesaria para que el linfocito comience el escaneo de la células dendrítica (Sancho et al. 2002). A continuación participan CD2 y CD58 (LFA-2 y LFA-3, respectivamente), proteínas que pertenecen a la familia de las superinmunoglobulinas con un tamaño similar al TCR y que por lo tanto se situarán en su entorno. Además, las quimioquinas presentes en la zona estimulan la actividad de la integrina LFA-1, provocando un nivel de activación transitorio que enlentece el movimiento del linfocito T alargando cada contacto y favoreciendo la liberación de Ca^{2+} intracelular (Dustin 2014, Munoz et al. 2014). Todo este proceso da lugar al fenómeno de extensión o *spreading* del linfocito T sobre la célula dendrítica, y en consecuencia al aumento de la superficie de contacto entre las dos células (Yokosuka et al. 2010).

Durante el reconocimiento de la células dendrítica, los linfocitos presentan un fenotipo polarizado por el efecto de las quimioquinas presentes en la zona T (Bromley et al. 2002), es decir, presentan un frente de avance o lamelipodio, una lamela y un urópodo (Bromley et al. 2001). El lamelipodio es una zona muy sensible en la que se desencadenará la activación del TCR, la liberación de Ca^{2+} (Wei et al. 1999, Bromley et al. 2001) y la polimerización de actina. La actina allí presente es rica en cofilina, mientras que la situada en la zona de la lamela, contiene más tropomiosina y talina. La organización de las moléculas en esta estructura presenta cierta analogía con la distribución final de las mismas en la sinapsis madura y se denomina kinapsis (Dustin 2007) (Fig. 4).

2. Formación de microagregados de moléculas del TCR

En la superficie del linfocito T virgen las moléculas del TCR se encuentran agrupadas en pequeños conjuntos formados por entre 5 y 20 moléculas. Son auténticas “islas proteicas” ancladas a la actina polimerizada (F-actina) cortical (Lillemeier et al. 2010).

Las moléculas de TCR situadas en el lamelipodio escanean la presencia de péptidos específicos presentados por el MHC II de la célula dendrítica. Cuando el TCR reconoce a su antígeno específico se inicia la señalización que desencadena, entre otras cosas, una rápida polimerización de actina, que induce la agrupación de las “islas proteicas” en conjuntos más grandes llamados microagregados (grupos de 300 moléculas de TCR aproximadamente) que potencian la señalización del TCR. En esas condiciones se origina la señal de parada que indica que el linfocito ha terminado su búsqueda. El citoesqueleto de actina durante todo este proceso es imprescindible, de hecho, la inhibición de la polimerización de la actina impide la formación de estos microagregados, impidiendo así que se desencadene la señalización a través del TCR y alterando en consecuencia la activación del linfocito T (Valitutti et al. 1995, Nolz et al. 2007).

Estos microagregados contienen moléculas de TCR junto con otras proteínas de membrana

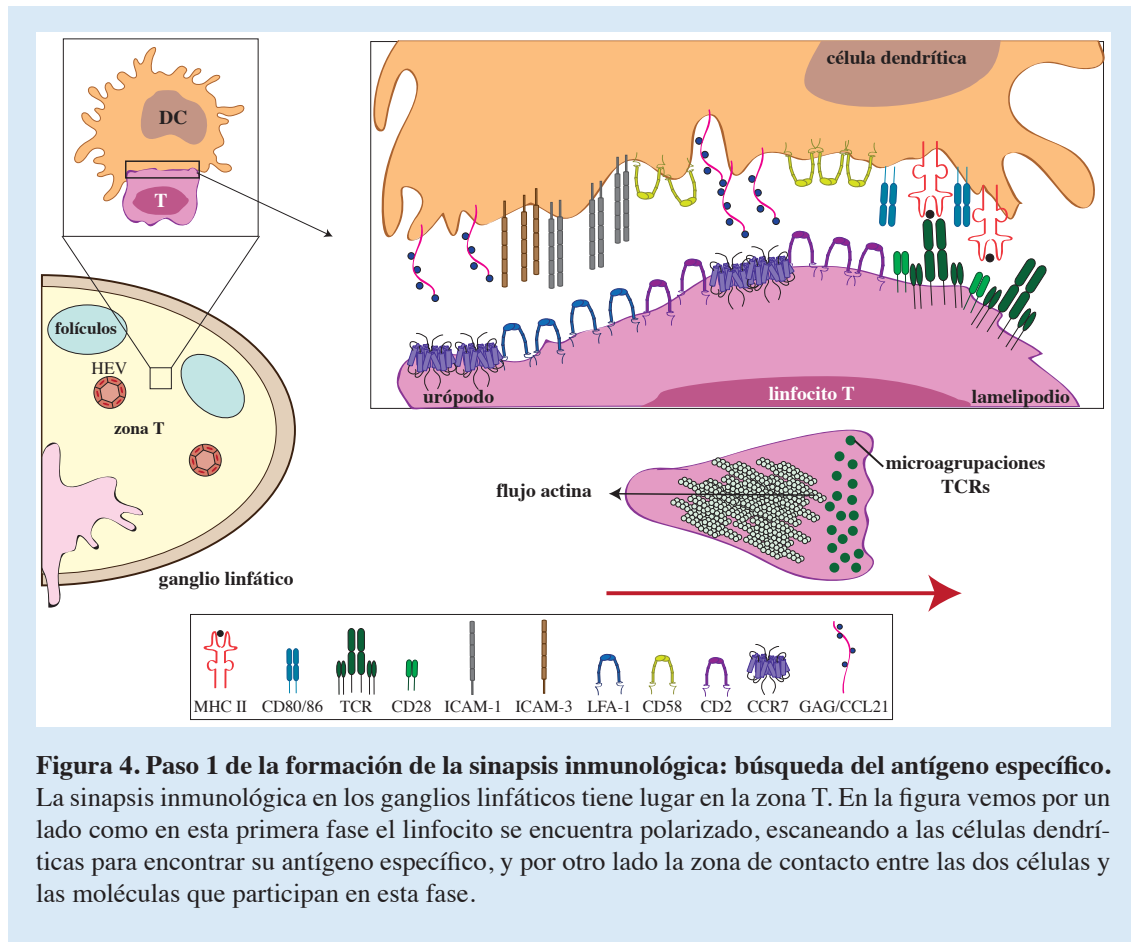
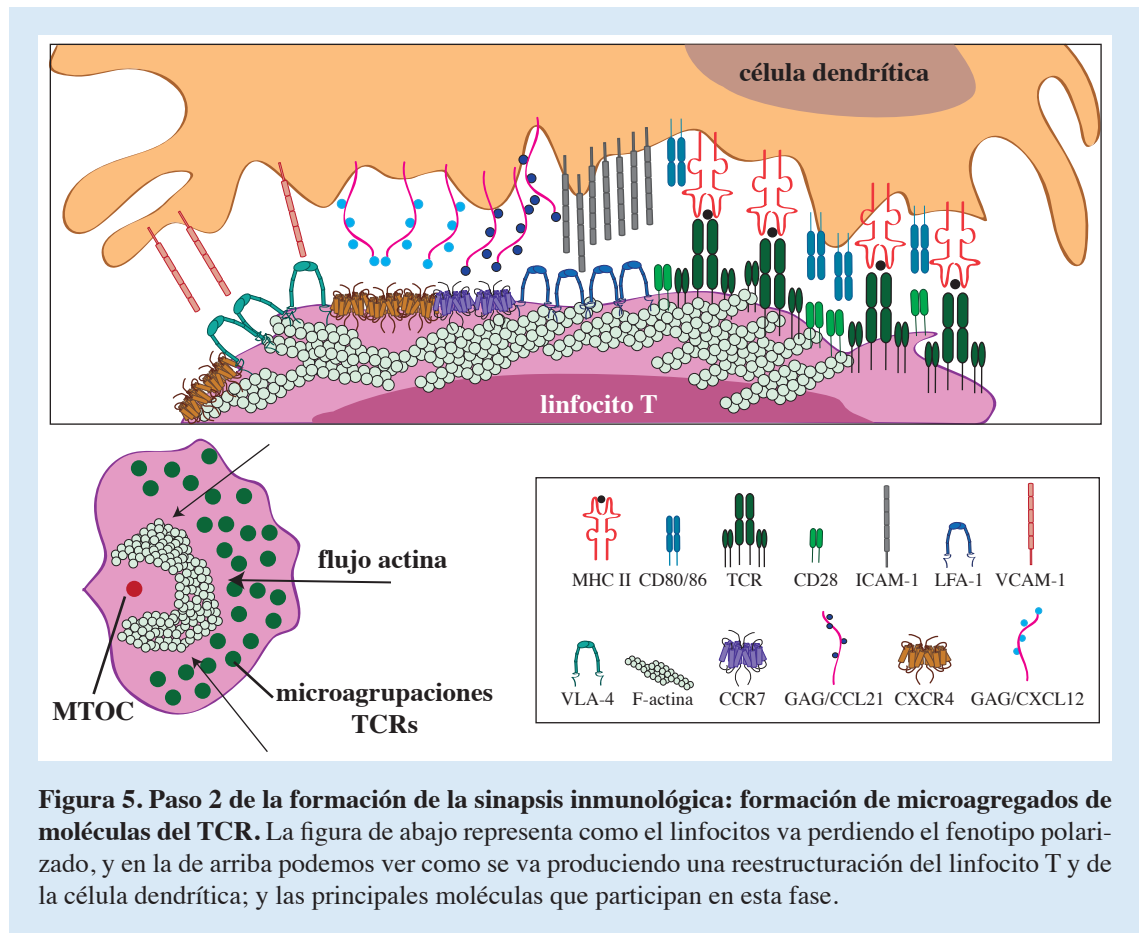


Figura 4. Paso 1 de la formación de la sinapsis inmunológica: búsqueda del antígeno específico. La sinapsis inmunológica en los ganglios linfáticos tiene lugar en la zona T. En la figura vemos por un lado como en esta primera fase el linfocito se encuentra polarizado, escaneando a las células dendríticas para encontrar su antígeno específico, y por otro lado la zona de contacto entre las dos células y las moléculas que participan en esta fase.

como CD28 (Alarcon et al. 2011), receptor coestimulador perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas y que se une a sus ligandos CD80 y CD86 (también conocidos como B7-1 y B7-2 respectivamente) situados en la superficie las células dendríticas (Boomer et al. 2010). CD28 es muy importante en la formación de la sinapsis inmunológica; por un lado su activación es necesaria para la secreción de IL-2 por el linfocito T y para su proliferación. CD28 es imprescindible para el reclutamiento de la proteína quinasa C- θ (PKC- θ), proceso mediado por un miembro de la familia de las Src quinasas, la tirosina quinasa específica de leucocitos o Lck (Yokosuka et al. 2008, Kong et al. 2011). PKC- θ promueve la expresión de los factores de transcripción NF- κ B y NFAT que se unirán al promotor de la IL-2, facilitando su expresión. Además, la activación de CD28 mejora la supervivencia del linfocito induciendo la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-X_L. En este mismo contexto se ha visto que también activa a la fosoinositol 3-quinasa (PI3K) que favorece ambos procesos (Boomer et al. 2010). Por otro lado, CD28 promueve un ambiente adecuado para la señalización y amplificación de la señal del TCR, favoreciendo el agrupamiento de balsas lipídicas que promueven el tráfico de moléculas señalizadoras (Hashimoto-Tane et al. 2010).

El TCR y la presencia de las quimioquinas colaboran en la activación de la integrina LFA-1 que se unirá a su ligando ICAM-1 en la superficie de la célula dendrítica, promoviendo así su agrupación y potenciando su activación. Este efecto es mediado por la asociación de la integrina con la talina gracias a la polimerización de la actina, que a su vez aumentará la movilidad de los agregados formados por las integrinas y sus ligandos (Delon et al. 2002, Dustin 2008b) (**Fig. 5**).



3. Sinapsis inmunológica madura

Una vez que se ha desencadenado la señalización a través del TCR, se produce una reestructuración, tanto en la membrana como en el interior de las dos células implicadas, originando una estructura tridimensional, caracterizada por la formación de agrupaciones de distintas moléculas y que está dividida en zonas bien definidas conocidas como SMACs (*Supra Molecular Activation Clusters*) y que en conjunto se conocen como ojo de buey (Monks et al. 1998).

En la estructura podemos identificar dos anillos concéntricos que rodean a un anillo central denominado SMAC central (cSMAC). Estos anillos desde dentro hacia fuera son el SMAC periférico (pSMAC) y el SMAC distal (dSMAC). Las moléculas presentes en cada zona varían desde el inicio de la formación de la sinapsis, hasta que se trata de una sinapsis madura. Existe analogía entre la estructura de la kinapsis y la estructura de ojo de buey debida a las moléculas que podemos encontrar en las distintas zonas, así podríamos decir que el lamelipodio se corresponde con el dSMAC, la lamela con pSMAC y el urópodo con el cSMAC.

Como se ha mencionado anteriormente, los microagregados de moléculas de TCR se forman en el lamelipodio, donde se desencadenará la señalización a través del mismo y dará lugar entre otros a la reestructuración del citoesqueleto de actina. Estos microagregados comienzan a migrar de forma centrípeta hacia el centro de la estructura hasta llegar a ocupar el cSMAC. En este movimiento juegan un papel clave las dinámicas del citoesqueleto de actina y la red de tubulina:

- **Citoesqueleto de actina:** se produce un flujo retrógrado de la actina polimerizada en el lamelipodio y una contracción producida en la zona de la lamela debida a la presencia de

la miosina II (Dustin 2008a, Kumari et al. 2014). Este flujo acabará situando a la actina polimerizada en el dSMAC.

- **Citoesqueleto de tubulina:** la activación del TCR también produce una reorganización de la red de tubulina dando lugar a la translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) hacia el cSMAC, proceso en el que participa el complejo dineína-dinactina (Martin-Cofreces et al. 2008), y que generará el movimiento de los microagregados a lo largo de los microtúbulos hasta el cSMAC (Hashimoto-Tane et al. 2011) (**Fig. 6**).

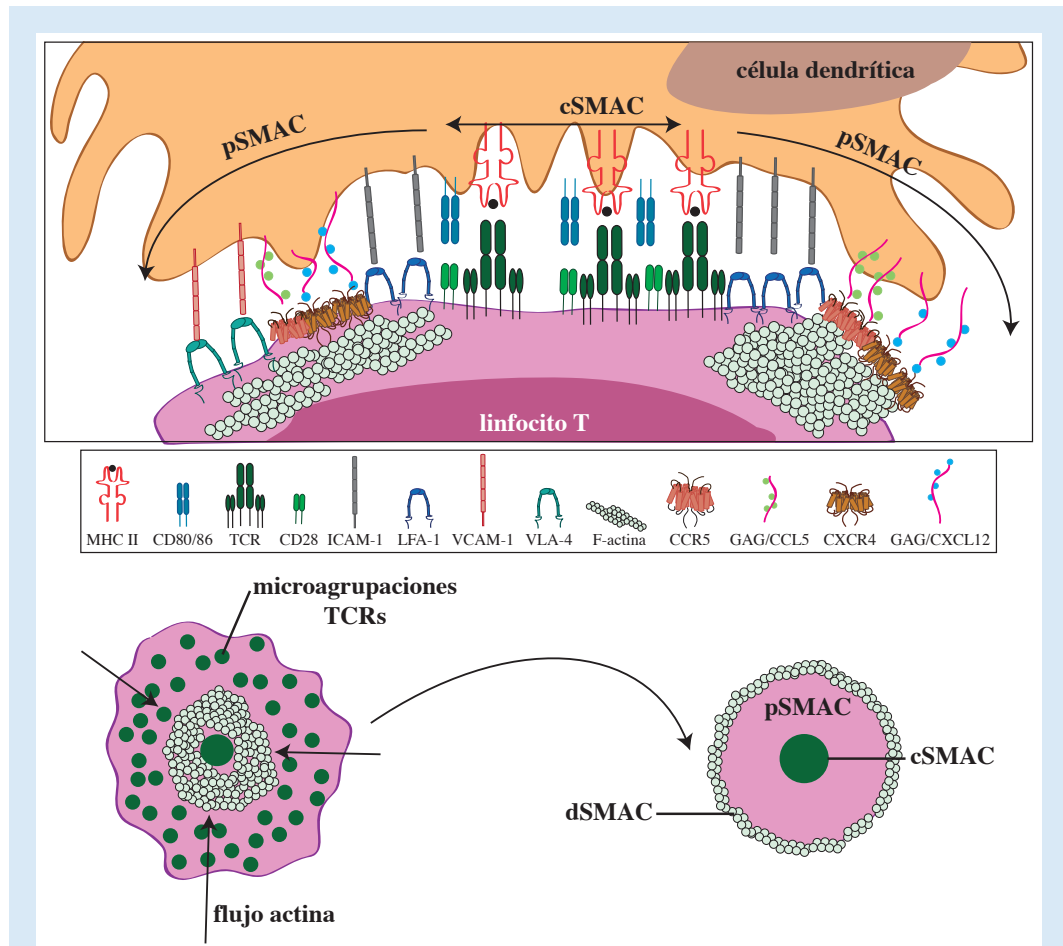


Figura 6. Paso 3 de la formación de la sinapsis inmunológica: sinapsis inmunológica madura. La figura de abajo muestra como en esta última fase se definen los SMACs, dando lugar a la estructura de ojo de buey, y la figura de arriba representa la reestructuración final de la zona de contacto entre las dos células y las moléculas que participan en ella así como su localización.

2.2. Estructura de la sinapsis inmunológica. SMACs

En una sinapsis madura, en la interfase que divide la zona de contacto entre el linfocito T CD4⁺ y la célula dendrítica podemos diferenciar los SMACs:

- **cSMAC:** comprende la zona central de la estructura y en él se localizan microagrupaciones de moléculas de TCR unidas a su antígeno específico presentado por el MHC II, así como

aquellas moléculas que participan en su señalización (PKC θ , Lck, Zap-70, LAT, SLP-76 o PLC). Se ha demostrado que la señalización a través del TCR requiere la formación continua de los microagregados en la zona más externa y su posterior migración hacia el centro (Dustin 2008a). Aquí también encontraremos a las moléculas coestimuladoras, CD28 unido a sus ligando CD80 y CD86, y a CD4. Esta región puede dividirse en dos subregiones, endo-cSMAC donde el TCR y CD28 están continuamente señalizando y exo-cSMAC formada por vesículas extracelulares de moléculas de TCR que normalmente son internalizadas por la APC (Dustin 2014).

- **pSMAC:** en paralelo a la formación del cSMAC comienza a formarse este anillo. Allí, se sitúan las integrinas LFA-1 y VLA-4, que conectarán con sus ligandos ICAM-1 y VCAM-1, respectivamente, en la superficie de la célula dendrítica (Rodríguez-Fernandez et al. 2010). Las integrinas tienen un papel estabilizador de toda la estructura y facilitan el mantenimiento del contacto entre las dos células. Se activan mediante un mecanismo desde dentro afuera de la célula (*inside-out*). El TCR activo provoca la apertura de la conformación inicialmente cerrada de las integrinas y posibilita así la unión a sus ligandos, promoviendo la señalización y aumentando la adhesión entre el linfocito y la células dendrítica. En el pSMAC también se han situado algunos receptores de quimioquinas, como es el caso de CXCR4 y CCR5, que pueden formar heterodímeros entre ellos y cooperar en la señalización (Contento et al. 2008, Viola et al. 2010). La señalización promovida por la activación de estos receptores colabora en la señal inicial del TCR que posibilita la conformación activa de las integrinas (Perez-Martinez et al. 2010, Viola et al. 2010). La talina, molécula asociada a la activación de las integrinas, también se situará en este anillo.
- **dSMAC:** la región más externa de esta estructura, incluye moléculas como CD45 y CD43. Esta última interacciona con la ezrina y moesina, moléculas que conectan con la actina, que también se sitúa en este anillo (Shaffer et al. 2009).

2.3. Señalización del TCR

La unión del TCR con su antígeno específico presentado por el MHC II desencadena la señalización. En primer lugar la quinasa Lck fosforila los residuos ITAM de la cadena citosólica del CD3 ζ y también fosforila y se asocia a CD4. Esto permite el reclutamiento y activación de Zap-70 (Freiberg et al. 2002) que activa a dos proteínas adaptadoras que amplifican la señal. Primero, fosforila a LAT que se activa y recluta a SLP76 (Campi et al. 2005). En este punto de la cadena de señalización el complejo LAT/SLP76 interacciona con multitud de moléculas señalizadoras que activarán distintas rutas de señalización (**Fig. 7**):

- LAT interacciona directamente con PLC γ 1 que origina segundos mensajeros a partir del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$), el inositol 3,4,5-trifosfato (IP $_3$), que difunde en el citoplasma y tras unirse a su receptor específico en el retículo provoca la liberación de Ca $^{2+}$ de sus reservas intracelulares y el diacilglicerol (DAG), que activa a la PKC.
- Facilita la activación de la ruta de las MAP quinasas (MAPK) a través la interacción con el

- complejo Grb2/SOS, que actuará sobre la familia Ras.
- Se une a la subunidad reguladora de PI3K y a la quinasa Itk, induciendo la producción de IL2.
 - Regula el citoesqueleto de actina mediante el reclutamiento de Vav1, un GEF de la familia de las Rho GTPasa, que activa a Cdc42 y Rac1. Estos se unen y activan a WASp y WAVE2, respectivamente, y ambos interaccionan con el complejo Arp2/3, que también se unirá a HS1, previamente activado por la maquinaria del TCR y que estabilizará la actina polimerizada. El complejo formado por WASP participa en la internalización de las moléculas de TCR, mientras que WAVE2 está implicado en la activación de las integrinas y en la formación del lamelipodio (Billadeau et al. 2007). Todo esto indica que Vav1 es un punto clave en el control de la polimerización de actina a través de la señalización del TCR (Tybulewicz 2005, Ksionda et al. 2012).
 - Participa en la activación de las integrinas desde el TCR. El regulador central de este proceso va a ser Rap1, una GTPasa miembro de la familia Ras :
 - La proteína adaptadora ADAP se une a SLP76 y esto permite que se forme el complejo ADAP/SLP76/SKAP55 que mediante RIAM permite la asociación con Rap1, para cuya activación es importante la activación previa de PKD1. Rap1 se asociará con RALP y este se unirá a la subunidad α L de LFA-1 activándola. Esta asociación es importante para la agrupación y por lo tanto para modular la afinidad de la integrina (Kinashi 2005, Hogg et al. 2011).
 - El complejo Rap1/RIAM también se puede unir a la talina controlando así la activación de las integrinas (Smith-Garvin et al. 2009).

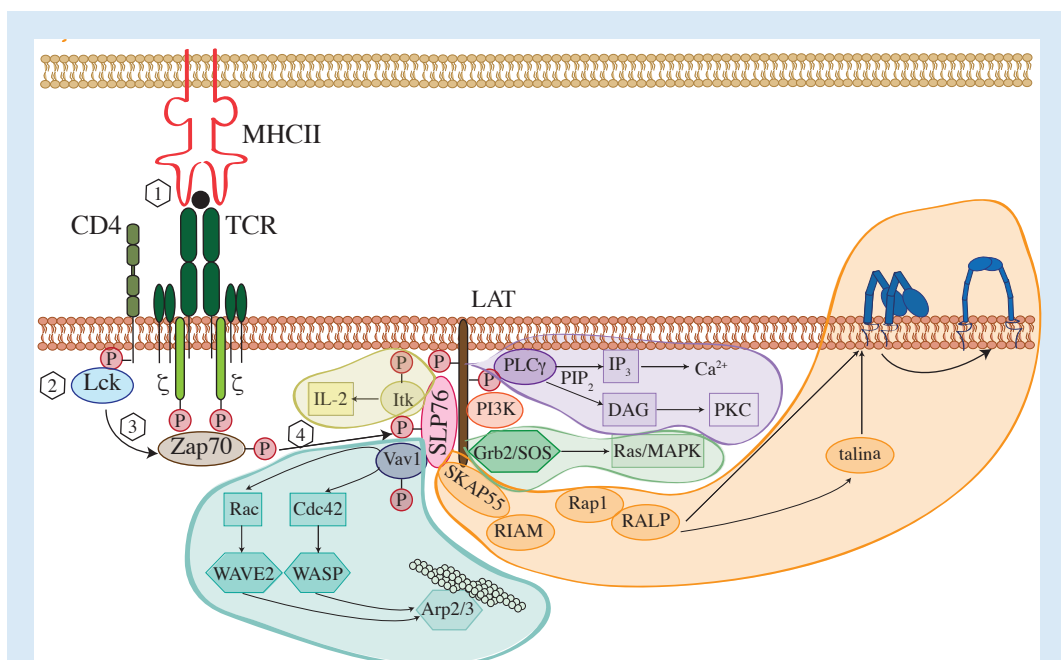


Figura 7. Señalización del TCR. El esquema representa la cadena de señalización desencadenada tras la activación del TCR. El TCR reconoce a su antígeno específico (1) y se produce la fosforilación de Lck (2) que fosforila a los residuos ITAM del CD3 y recluta y fosforila a Zap70 (3) que activa al complejo LAT/SLP76 (4) que recluta a distintas moléculas y activa múltiples rutas de señalización, representadas con distintos colores en la figura.

3. Quimioquinas y sus receptores

3.1. Las quimioquinas

Las quimioquinas son proteínas de bajo peso molecular (6-14kDa), originalmente descritas como citoquinas proinflamatorias que promovían el reclutamiento de células del sistema inmune a los tejidos en los que existía una inflamación (Baggiolini 1998), pero hoy en día se sabe que participan tanto en procesos fisiológicos como patológicos (Stephens et al. 2013). Entre los procesos fisiológicos destacan el desarrollo, homeostasis y función del sistema inmune (Ara et al. 2003, Love et al. 2011), pero también participan en procesos, como el desarrollo embrionario (Zou et al. 1998) o la angiogénesis (Sozzani et al. 2015). En cuanto a las patologías, las quimioquinas están involucradas entre otros, en enfermedad autoinmunes (Ribeiro et al. 2005), en la formación de lesiones ateroscleróticas (Charo et al. 2004), en la infección por VIH-1 (Lusso 2006) y en cáncer (Chow et al. 2014).

3.1.1. Clasificación y estructura

Las quimioquinas poseen una alta homología estructural y las aproximadamente 50 miembros que hay descritas en humanos se clasifican en base de la disposición de sus 4 residuos de cisteína altamente conservados (**Fig. 8**):

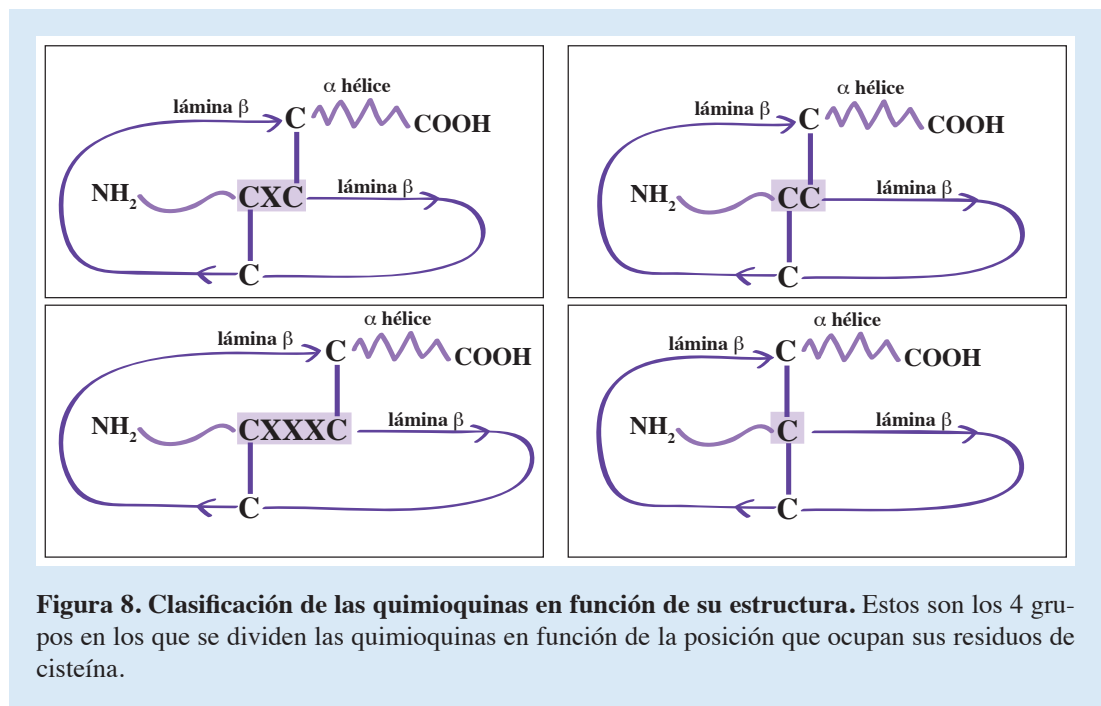
- **CXC**: este grupo es muy numeroso y se caracteriza por tener un aminoácido intercalado entre las dos primeras cisteínas de su secuencia.
- **CC**: la mayoría de las quimioquinas quedan repartidas entre este grupo y el anterior. En este caso las dos primeras cisteínas son adyacentes.
- **CX3C**: a este grupo sólo pertenece CX3CL1 y tiene tres aminoácidos entre sus dos primeras cisteínas.
- **C**: únicamente poseen dos de las 4 cisteínas. En este grupo sólo hay dos miembros, XCL1 y XCL2.

Sin embargo, hoy en día se prefiere una clasificación desde un punto de vista funcional, agrupando las quimioquinas en homeostáticas e inducibles. Las quimioquinas homeostáticas se expresan constitutivamente y participan en procesos fisiológicos de desarrollo del sistema,

como por ejemplo CCL21 que dirige la migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos o CXCL13 que posiciona los linfocitos B en los folículos linfoides. Las quimioquinas inducibles, en cambio, se producen en respuesta a un estímulo inflamatorio, como ocurre con CCL2 y CCL5.

En cuanto a la estructura de las quimioquinas, podemos diferenciar 3 dominios estructurales, la región C-terminal, implicada en la unión a los glicosaminoglicanos (GAGs), la región central, definida por un bucle largo, una hélice 3_{10} y tres láminas β -antiparalelas, y la región N-terminal, implicada en la unión al receptor (Allen et al. 2007, Kufareva et al. 2015, Monneau et al. 2015).

Los GAGs son cadenas largas y no ramificadas de heteropolisacáridos que tienen un papel muy importante en la fisiología de las quimioquinas, ya que son esenciales para que lleven a cabo su función in vivo. Permiten la oligomerización de las quimioquinas y la formación de gradientes quimiotácticos en la superficie celular, reteniendo a las quimioquinas y evitando así que se diluyan en el torrente sanguíneo (Allen et al. 2007).



3.2. Receptores de quimioquinas

3.2.1. Estructura y clasificación

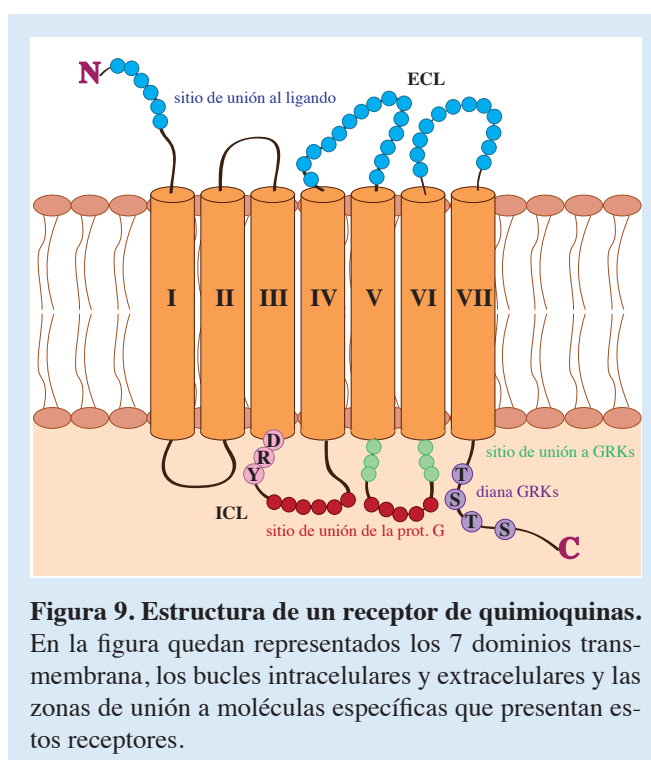
Los receptores de quimioquinas se localizan en la superficie celular y pertenecen a la familia de los receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G (GPCRs), en concreto pertenecen al grupo más numeroso de todos, la subfamilia rodopsina (Fredriksson et al. 2003).

Su estructura consiste en una cadena polipeptídica de aproximadamente 350 aminoácidos

(40KDa) que atraviesa 7 veces la membrana celular (TM I-VII), formando bucles en la parte externa de la célula y en la parte interna; de manera que el extremo N-terminal y tres bucles quedan en la parte exterior de la célula (ECL), y participan en la unión al ligando, y el extremo C-terminal y otros 3 bucles quedan en el interior de la célula (ICL), y permiten el reclutamiento de moléculas señalizadoras. Además, el extremo C-terminal está relacionado con la internalización del receptor y el fin de la señalización a través del mismo (Nibbs 2007). Los receptores de quimioquinas poseen un motivo conservado de aminoácidos al final del TM III, conocido como motivo DRY por las siglas de los aminoácidos que lo forman (**Fig. 9**). El alto nivel de conservación de este motivo entre los receptores de quimioquinas indica su importancia funcional. De hecho, la sustitución del residuo tirosina (Y) por una fenilalanina (F) origina receptores no funcionales (Hauser et al. 2016). Hoy en día se ha resuelto la estructura de los cristales de los receptores CXCR4 (Wu et al. 2010) y CCR5 (Tan et al. 2013).

Los receptores de quimioquinas se clasifican en 4 grupos distintos, según el tipo de quimioquinas que unen, así tenemos: CX3CR, CXCR, CCR y XCR. Además, hay un quinto grupo llamado atípico (ACRs): ACKR1 (DARC), ACKR2 (D6), ACKR3 (CXCR7), ACKR4 (CCRL1), ACKR5 (CCRL2) y ACKR6 (PITPNM3) (Bachelier et al. 2014a, Bachelier et al. 2014b). Los receptores atípicos no poseen o tienen modificado el dominio DRY, y por lo tanto no señalizan vía proteína G, pero sí unen b-arrestinas. Su función principal es regular los niveles locales de quimioquinas, es decir actúan como “scavengers”, (Ulvmar et al. 2011, Graham et al. 2012). Recientemente se ha descrito que algunos de ellos son capaces de heterodimerizar con los receptores clásicos modulando su respuesta funcional (Nibbs et al. 2013).

También existen quimioquinas y receptores codificados por virus, que mimetizan a los receptores de quimioquinas y ligandos de los hospedadores como US28, ORF74 o M33, que podrían participar en el proceso de escape del virus del ataque del sistema inmune (Alcami 2003).



3.2.2. Oligomerización de los receptores de quimioquinas

Clásicamente los receptores de la familia GPCRs han sido considerados moléculas individuales en la superficie celular, sin embargo, la aplicación de nuevas tecnologías de imagen ha permitido determinar que al igual que otros GPCR, los receptores de quimioquinas forman homo y heterodímeros durante su síntesis y maduración en el retículo endoplasmático, y de este modo llegan a la membrana celular. De hecho estos complejos se detectan en ausencia de ligando (Martínez Muñoz et al. 2009). Son complejos dinámicos que se regulan por la expresión de receptores en la membrana celular y por los niveles de ligando que la célula detecta.

La cristalización de CXCR4 en presencia de antagonistas ha confirmado que estructuralmente los dímeros de este receptor pueden existir y que ésta es su conformación más estable (Wu et al. 2010).

Las evidencias sugieren que las zonas implicadas en la dimerización se localizan en las regiones TM, aunque de momento no se ha definido un motivo concreto de dimerización que esté conservado en la familia.

Además, también se pueden formar heterodímeros, complejos entre receptores de quimioquinas distintos. Estos parecen estar relacionados con un papel modulador en la respuesta a sus ligandos. Existen varios ejemplos de la relevancia funcional de estas formaciones; así por ejemplo, “in vitro” el complejo CCR2/CCR5 activa una señalización diferente a la que desencadenarían cada uno de estos receptores por separado (Mellado et al. 2001, Mellado et al. 2002); CXCR5/EBI2 regula negativamente la señalización vía CXCR5 en los linfocitos B (Barroso et al. 2012) y algo similar sucede con el heterodímero CXCR4/ACK3 (Sierro et al. 2007, Levoye et al. 2009).

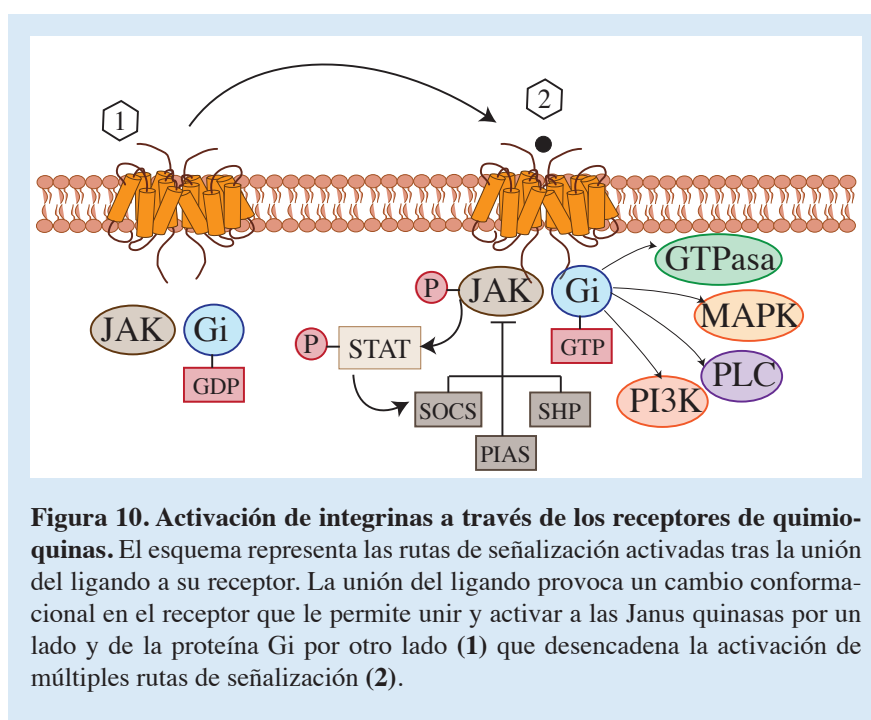
3.2.3. Señalización de proteínas G

Los receptores de quimioquinas están acoplados a proteínas G. Éstas, son complejos heterotriméricos que se caracterizan por su capacidad para unir nucleótidos de guanina, (GTP y GDP). Están formadas por 3 subunidades (α , β , γ) que presentan mucha variabilidad. En función del tipo de subunidad a que tengan hay varios tipos de proteínas G que, además, tienen funciones diferentes, por ejemplo, $G_{\alpha i}$, inhibe a la adenilato ciclasa; $G_{\alpha s}$, activa a la adenilato ciclasa; $G_{\alpha q}$, actúa sobre la PLC y $G_{\alpha_{12}}$ activa a Rho (Cotton et al. 2009). Cuando el receptor está inactivo, las tres subunidades se encuentran formando un complejo estable donde la subunidad G_{α} se encuentra unida a GDP.

La señalización de los receptores de quimioquinas se inicia cuando el ligando se une al extremo N-terminal del receptor y después, con varios residuos de los bucles extracelulares. El cambio conformacional provocado en el receptor se traslada a la proteína G y ello facilita la sustitución de GDP, unido a la subunidad α , por GTP. De este modo se aleja esta subunidad del complejo $G\beta\gamma$, iniciándose así la cascada de señalización (Levoye et al. 2009). La activación de la proteína G lleva a activación de segundos mensajeros como PLC, GTPasas, PI3K y MAPK entre otros (**Fig. 10**).

La activación del receptor acaba cuando la subunidad $G\alpha$ que posee actividad GTPasa, hidroliza la molécula de GTP, quedando entonces unida a GDP y volviendo así a su estado inactivo. Este proceso está controlado por los reguladores de la señalización de la proteína G (RGS), que se asocian al complejo $G\alpha$ -GTP y por las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs) que aceleran la hidrólisis de las moléculas de GTP.

Los receptores de quimioquinas son internalizados en vesículas de clatrina. En este proceso participan las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) que fosforilan al receptor activo en residuos de treonina y serina del extremo C-terminal y permiten el reclutamiento de la moléculas adaptadoras adaptina-2 (AP-2) y β -arrestina, que mediarán la endocitosis del receptor mediante su unión a clatrina (Neel et al. 2005).

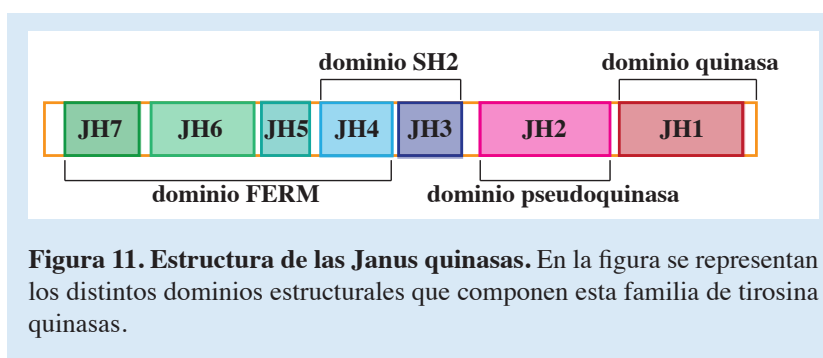


3.2.4. Ruta JAK/STAT (*Janus kinase/ Signal transducer and activator of transcription*)

La familia de las Janus quinasas fue descrita hace más de 20 años (Wilks 1989, Wilks et al. 1991) y está compuesta por tres miembros, JAK1, JAK2, y Tyk2 que se expresan de manera ubícuca en el organismo, y un cuarto miembro, JAK3, cuya expresión se restringe en gran medida a células de origen hematopoyético, aunque varía con el estado de activación celular (Kawamura et al. 1994). Se trata de proteínas con actividad tirosina quinasa que tienen un papel esencial en la señalización intracelular de las citoquinas. Los receptores de citoquinas se encuentran en la superficie celular formando complejos de varias subunidades, y no poseen actividad enzimática intrínseca, por lo que su actividad depende de su asociación constitutiva a las Janus quinasas.

Estructura y activación

Las Janus quinasas son proteínas de alto peso molecular (120-140kDa), que presentan una alta homología en su estructura. Se caracterizan por presentar 7 dominios bien conservados o dominios JH numerados del 1 al 7 empezando por el más cercano al extremo C-terminal. Los dominios JH1 y JH2 constituyen un dominio tirosina quinasa y pseudoquinasa respectivamente. Este último a pesar de no tener actividad quinasa es muy importante en la regulación de la actividad de estas proteínas (Chen et al. 2000, Rane et al. 2000). Los dominios JH3 y JH4 comprenden un dominio tipo SH2 y los dos últimos JH6 y JH7 están formados por un dominio de homología tipo Banda 4.1 ezrina, radixina y moesina o dominio FERM, que participa en la interacción con proteínas transmembrana (Yamaoka et al. 2004) (**Fig. 11**).



En cuanto a su activación, la unión de las citoquinas a su receptor promueve un cambio conformacional en el mismo que facilita el cambio de posición de las proteínas JAK y su fosforilación cruzada en residuos de tirosina. Además, también fosforilan al receptor lo que permite el reclutamiento de los factores de transcripción de la familia STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), que tienen dominios de homología con Src 2 (SH2). Los STAT son entonces también fosforilados formando complejos diméricos, que tras separarse del receptor se translocan al núcleo regulando la expresión génica (Murray 2007, Babon et al. 2014).

Esta ruta de señalización también está implicada en la señalización de los receptores de quimioquinas aunque en este caso las Janus quinasas no parecen estar asociadas constitutivamente al receptor (Mellado et al. 1998, Vila-Coro et al. 1999, Wong et al. 2003). Tampoco se conoce si hay especificidad entre receptores de quimioquinas y los miembros de las Janus quinasas o de la familia STAT, ni si su activación es específica sólo de algún tipo celular (**Fig. 10**).

La regulación y finalización de la señalización de esta ruta puede producirse a través de distintos mecanismos: por impedimento de la actividad transcripcional de los STAT debido a la acción de las proteínas PIAS (*Protein inhibitor of activated STAT*), por defosforilación de las JAK provocado por el efecto de tirosina fosfatasa de la familia SHP (*SH2-containing protein tyrosine phosphatase*) o por la expresión de proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCS), que bloquean la actividad de los JAK y los ubiquitinan para su degradación (David et al. 1995, Arora et al. 2003, Yoshimura 2005) (**Fig. 10**).

3.3. CXCR4 y su ligando CXCL12

CXCR4 es un receptor constitutivamente expresado en la gran mayoría de las células, tiene un ligando específico, CXCL12, también conocido como factor derivado de estroma (SDF-1 α), debido a que se aisló por primera vez a partir de una línea de células de estroma de ratón (Tashiro et al. 1993). CXCL12 es una quimioquina homeostática, secretada principalmente por las células estromales de la médula ósea, donde su unión a CXCR4 permite la retención de los precursores hematopoyéticos hasta completar su diferenciación (Broxmeyer et al. 2005). También dirige la salida de neutrófilos de la médula ósea y la vuelta a la misma de neutrófilos senescentes (Murphy et al. 2000). Pero también es secretada por otros tipos celulares estando presente en la mayoría de los tejidos, donde promueve adhesión, quimiotaxis, proliferación y supervivencia celular (Busillo et al. 2007).

CXCR4 también se expresa ampliamente en tejidos diferenciados y no diferenciados. Se encuentra prácticamente en todas las células hematopoyéticas, en el endotelio vascular, en neuronas, tanto desde sistema nervioso central, como del sistema nervioso periférico, en células de la microglia, en astrocitos... etc (Li et al. 2008). Su actividad se asocia a migración, posicionamiento celular, procesos de neovascularización, supervivencia y crecimiento (Zou et al. 1998, Sugiyama et al. 2006). También se ha detectado su expresión en células tumorales de origen hematopoyético y no hematopoyético (Balkwill 2004).

Su relevancia funcional se pone de manifiesto al determinar que los ratones deficientes en CXCR4 o CXCL12 no son viables y mueren en estado embrionario. Tienen una mielopoyesis defectiva, defectos en la linfopoyesis de linfocitos B, en la colonización de la médula ósea, en la formación del septum cardiaco, en el desarrollo del cerebelo y en la vasculatura del estómago (Nagasawa et al. 1996, Zou et al. 1998).

También hay ratones que expresan un mutante de CXCR4 (Cxc4^{+/-1013}) que es resistente a la desensibilización, y en ellos se observa una compartimentalización en periferia de los linfocitos B anormal, con una reducción de los folículos primarios en el bazo y ausencia de los mismos en los ganglios linfáticos (Balabanian et al. 2012). En humanos se ha descrito un mutante de CXCR4 con una delección en el extremo C-terminal que origina el síndrome de WHIM, una inmunodeficiencia combinada rara producida por la retención de leucocitos maduros en la médula ósea, que cursa con neutropenia, mielocatexis, pérdida de la capacidad para hacer el cambio de clase a IgG, hipogammaglobulinemia, infecciones de modo recurrente y la presencia de verrugas. (Hernandez et al. 2003, Kawai et al. 2007). La causa radica en que la delección observada impide la inactivación e internalización del receptor, por lo que siempre está activo en presencia de CXCL12.

CXCR4 señala del mismo modo que los demás receptores de quimioquinas, la unión de su ligando, CXCL12, provoca un cambio conformacional en el mismo que activa a la proteína Gi. Su señalización es sensible al tratamiento con toxina pertúsica (PTx) que produce la ADP ribosilación de G α i. La activación de la proteína G desencadena la activación de PI3K, PLC, y Rho, dando lugar a distintas funciones como migración, adhesión o transcripción de genes (Busillo et al. 2007). Pero CXCR4 también es capaz de señalizar de manera independiente de la proteína G a través de

las Janus quinasas (Vila-Coro et al. 1999). Su internalización depende de su fosforilación por GRK, de la unión a b-arrestinas y de la formación de vesículas de clatrina (Busillo et al. 2007).

“In vivo” CXCL12 tiene una alta afinidad por el heparán sulfato, facilitando así la formación de gradientes quimioatrayentes (Busillo et al. 2007). CXCR4 en ausencia de ligando se encuentra formando dímeros o pequeños oligómeros, que se convierten en agrupaciones de receptores más grandes cuando se une a CXCL12 (Pawig et al. 2015). Experimentos de BRET (bioluminiscencia de transferencia de energía por resonancia) y FRET (transferencia de energía entre fluorocromos) demuestran que el proceso general de homo y heterodimerización asociado a estos receptores, también ocurre en CXCR4 (Contento et al. 2008, Levoe et al. 2009, Munoz et al. 2012).

El eje CXCR4/CXCL12 tiene un papel relevante en muchos procesos patológicos. Participa en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, habiendo detectado en pacientes con esta enfermedad la presencia de CXCR4 y CXCL12 en el cartílago articular y en el sinovio (Ribeiro et al. 2005), donde CXCL12 actúa como una citoquina proinflamatoria y permite el reclutamiento celular al lugar de la inflamación (Debnath et al. 2013). También se le ha relacionado con asma, expresándose en los linfocitos Th2 que provocan la respuesta alérgica inflamatoria; de hecho su bloqueo conlleva una mejoría en la enfermedad (Choi et al. 2012). En la esclerosis múltiple este eje tiene un doble papel, ya que por un lado ejerce un papel esencial en la supervivencia y migración de algunos precursores neuronales y además parece tener un efecto neuroprotector, pero por otro lado, participa en la inflamación y reclutamiento de células provocando daño tisular (Khorramdelazad et al. 2016).

CXCR4 está implicado en multitud de tipos de cáncer. Se expresa en células tumorales de al menos 23 tipos de cánceres distintos de origen epitelial, mesenquimal o hematopoyético, como cáncer de mama, de hígado, de colon, de pulmón, en melanoma y en leucemia (Balkwill 2004). La sobreexpresión de CXCR4 en estas células favorece el crecimiento del tumor, la angiogénesis y la formación de metástasis (Choi et al. 2012, Guo et al. 2015, Xu et al. 2015), y también está implicado en la proliferación y supervivencia de las células tumorales (Chatterjee et al. 2014).

Finalmente, indicar que CXCR4 también participa en la infección por VIH. Este virus entra en las células uniéndose a una glicoproteína de su envuelta, gp120, con CD4 y empleando como co-receptores a CXCR4 o CCR5 para fusionarse a la membrana de las células hospedadoras. De hecho los virus se clasifican en X4 o R5 en función del receptor de quimioquinas que empleen. Los ligandos naturales de CXCR4 y CCR5 son capaces de inhibir la entrada del virus, ya que bloquean los sitios de unión del receptor que la proteína gp120 necesita para fusionarse e inducen la internalización de receptor (Choi et al. 2012, Pawig et al. 2015).

V. Objetivos

Los receptores de quimioquinas se han relacionado clásicamente con el movimiento celular, de hecho, sus ligandos generan gradientes quimioatrayentes que direccionan el desplazamiento de la célula. En estos procesos la activación de la proteína G resulta clave; sin embargo, trabajos anteriores han propuesto, no sin cierta polémica, que las quimioquinas también eran capaces de activar a la ruta JAK/STAT, una vía generalmente asociada a la cascada de señalización de citoquinas. En este proyecto nos hemos propuesto analizar las consecuencias de reducir la expresión de JAK1 y JAK2 en algunas funciones asociadas a las quimioquinas, y poder así determinar con exactitud su relevancia funcional en estos procesos.

1. Determinar el papel de las Janus quinasas en la señalización desde los receptores de quimioquinas durante la migración de los linfocitos T vírgenes a los ganglios linfáticos.
2. Estudiar la implicación de la señalización activada por la unión de CXCL12 a CXCR4 en la formación de sinapsis inmunológicas:
 - a) Efecto de la ruta activada por Gi.
 - b) Efecto de la ruta activada por las Janus quinasas.
3. Analizar el mecanismo molecular que involucra a las Janus quinasas en la señalización por CXCL12.

VII. Materiales y métodos

1. Tampones

- PBS: KH_2PO_4 1mM, NaH_2PO_4 10mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM a pH 7,0.
- TBS: Trizma base 10mM, NaCl 150mM a pH 8,0.
- PBS-marcaje: suero fetal bovino (FBS) 0,1% y albúmina de suero bovino (BSA) 1% en PBS a pH 7,0.

2. Medios de cultivo

- Medio de depleción: RPMI1640 suplementado con HEPES 10mM y BSA al 0,1%.
- Medio para células primarias: RPMI1640 suplementado con FBS 10%, glutamina 2mM, HEPES 10mM y β -mercapto 50 μ M.
- Medio de células Jurkat: RPMI1640 suplementado con FBS 10%, glutamina 2mM y piruvato sódico 1mM.
- Condiciones del incubador: 5% CO_2 , 95% humedad y 37°C.

3. Anticuerpos

Los anticuerpos empleados en el desarrollo de esta Tesis quedan reflejados en tres tablas, agrupados en anticuerpos primarios empelados en experimentos de citometría y microscopía (**Tabla 1**), anticuerpos primarios empleados en Western Blot (**Tabla 2**) y anticuerpos secundarios (**Tabla 3**).

4. Inhibidores químicos

Cuando fue necesario los linfocitos T fueron trataron con los siguientes inhibidores:

4.1. Inhibidores del eje CXL12-CXCR4:

- **AMD3100:** bloquea de manera específica y reversible la unión de CXCL12 a su receptor CXCR4. Se utilizó a 10 μ M en medio completo durante 30 minutos a 37°C. Casa comercial SIGMA.
- **Toxina Pertussis (PTx):** esta toxina inhibe de modo irreversible a la subunidad $G_{\alpha i}$ de la proteína G. Se usó a 0,2 μ g/ml en medio completo durante 2 horas a 37°C. Casa comercial SIGMA.

4.2. Inhibidores de la ruta JAK/STAT:

Los linfocitos T CD4^+ se resuspendieron a una concentración de $2,5 \times 10^6$ /ml y se incubaron durante 30 minutos en el incubador con distintas concentraciones de los inhibidores:

- **Ruxolitinib:** inhibe a JAK1 y JAK2 y se empleó a 0,1; 0,3, y 1 μ M.
- **Tofacitinib:** inhibe a JAK3 y se empleó a 0,3; 1 y 3 μ M.

Ambos Inhibidores fueron cedidos por el Doctor Philip Cohen (Universidad de Dundee).

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en experimentos de citometría de flujo (FACS), inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IH).

Anticuerpo (anti-)	Isotipo	Concentración de uso	Técnica	Casa comercial
CD3 APC	IgG2b rata	1µg/ml	FACS	BioLegend
CD4 FITC	IgG2b rata	0,5µg/ml	FACS	Beckman Coulter
CD11a PE (LFA-1)	IgG1 rata	0,5µg/ml	FACS	BD Pharmigen™
CD11c FITC	IgG1 hámster	5µg/ml	FACS	BD Pharmigen™
CD25 PE	IgG1, λ rata	2µg/ml	FACS	BioLegend
CD44 PE	IgG1κ rata	1µg/ml	FACS	Beckman Coulter
CD54 biot. (ICAM-1)	IgG1κ hámster	0,5µg/ml	FACS	BD Pharmigen™
CD62L PE	IgG2a rata	1µg/ml	FACS	BD Pharmigen™
CD69 PE	IgG1 hámster	2µg/ml	FACS	BioLegend
CD80 PE	IgG2κ hámster	0,5µg/ml	FACS	BD Pharmigen™
CD86 PE	IgG2a rata	0,5µg/ml	FACS	BioLegend
CCR7 Biot.	IgG2a rata	1:200	FACS	eBioscience
CXCR4 PE	IgG2b rata	2µg/ml	FACS	BioLegend
CXCL12	IgG conejo	1:400	FACS	eBioscience
IA/IE FITC (MHCII)	IgG2a rata	5µg/ml	FACS	BD Pharmigen™
Vα2 PE	IgG2a rata	0,5µg/ml	FACS	BD Pharmigen™
p-tirosina (4G10)	IgG2b ratón	1:400	FACS, IF	Millipore
CD3ξ	IgG conejo	1:2000	IF	Dr. B. Alarcón
CD44 biotinilado	IgG2b rata	0,125µg/ml	IF	BD Pharmigen™
CXCR4 biotinilado	IgG2 rata	10µg/ml	IF	BD Pharmigen™
γ tubulina	IgG1ratón	0,5µg/ml	IF	Sigma-Aldrich™
p-PLCγ1	IgG conejo	1:200	IF	Cell Signaling
Talina	IgG cabra	2,6µg/ml	IF	Santa Cruz
CD45R (B220)	IgG1 ratón	1µg/ml	IH	Beckman Coulter
PNAd Alexa 633	IgMκ rata	1:200	IH	Nanotools (meca-79)

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en experimentos de inmunoprecipitación (IP) y Western Blot (WB).

Anticuerpo (anti-)	Isotipo	Concentración	Técnica	Casa comercial
p-tirosina	IgG conejo	1µg/ml	IP	Promega
β tubulina	IgG1 ratón	1µg/ml	WB	Sigma-Aldrich™
ERK1	IgG conejo	0,2µg/ml	WB	Santa Cruz
ERK2	IgG conejo	0,2µg/ml	WB	Santa Cruz
ERM	IgG conejo	0,2µg/ml	WB	Santa Cruz
JAK1	IgG conejo	0,4µg/ml	WB	Santa Cruz
JAK2	IgG conejo	1:1000	WB	Cell Signaling
pERM	IgG conejo	1:1000	WB	Cell Signaling
pERK	IgG2a ratón	0,2µg/ml	WB	Santa Cruz
Tyk2	IgG1 ratón	0,2µg/ml	WB	Santa Cruz
Vav-1	IgG conejo	1:1000	WB	Cell Signaling
Zap70	IgG2a ratón	0,25µg/ml	WB	BD

Tabla 3. Anticuerpos secundarios empelados.

Anticuerpo (anti-)	Especie	Concentración	Técnica	Casa comercial
conejo IgG(H+L) PE	cabra	0,5µg/ml	FACS	Beckman Coulter
estreptavidina PE	-	1µg/ml	FACS	Beckman Coulter
hámster IgG(H+L) FITC	cabra	0,5µg/ml	FACS	Southern
ratón IgG(H+L) PE	cabra	0,5µg/ml	FACS	Beckman Coulter
ratón IgG(H+L) FITC	cabra	2,5µg/ml	FACS	Beckman Coulter
cabra-Alexa Fluor 405	cabra	1µg/ml	IF	ThermoFisher
cabra-Alexa Fluor 647	burro	1µg/ml	IF	ThermoFisher
estreptavidina Alexa Fluor 568	-	2µg/ml	IF	ThermoFisher
ratón-Alexa488	cabra	1,5µg/ml	IF	Molecular Probes
ratón-Cy3	cabra	1,5µg/ml	IF	Jackson
estreptavidina Cy3	-	1µg/ml	IH	Jackson
ratón-Alexa647	cabra	5µg/ml	IH	ThermoFisher
ratón-HRP	cabra	1µg/ml	WB	Dako
conejo-HRP	conejo	2µg/ml	WB	Dako

5. Ratones

Para el desarrollo de esta tesis se han utilizado:

5.1. Ratones C57Bl/6:

Estos ratones se han empleado para la purificación de linfocitos T CD3⁺ vírgenes, con los que hemos realizado los experimentos de la primera parte de esta Tesis, y también, para la obtención de monocitos de médula ósea, que posteriormente se diferenciaron a células dendríticas y se emplearon para formar sinapsis inmunológicas.

5.2. Ratones OT2:

Se trata de ratones transgénicos, cuyos linfocitos T CD4⁺ expresan únicamente TCRs que reconocen a un péptido específico de la ovoalbúmina, el 323-339 (ILE-SER-GLN-ALA-VAL-HIS-ALA-ALA-HIS-ALA-GLU-ILE-ASN-GLU-ALA-GLY-ARG). Estos ratones fueron fenotipados mediante citometría de flujo, usando como marcador un anticuerpo anti-V α 2, específico para este tipo de receptores. Fueron cedidos por el Dr. C.Ardavín (CNB). A partir de estos ratones se purificaron los linfocitos T CD4⁺ con los que hemos realizado los experimentos de la segunda parte de esta Tesis.

5.3. Ratones cxcl12^{GagTm/GagTm}:

Estos ratones expresan un gen mutante para la quimioquina CXCL12 (Cxcl12^{GagTm}), produciendo un CXCL12 que tiene impedida su unión al glicosaminoglicano heparán sulfato, pero no tiene afectada su unión o señalización a través de CXCR4 (Rueda et al. 2012). Estos ratones fueron cedidos por el Dr F. Arenzana-Seisdedos. A partir de la médula ósea de estos ratones se purificaron células dendríticas que se emplearon para estudiar la importancia de los glicosaminoglicanos en nuestros experimentos de sinapsis.

Todos los procedimientos empleados han sido aprobados por el Comité de ética del CSIC y por la Dirección General de Medioambiente de la Comunidad de Madrid.

6. Obtención de células primarias

6.1. Purificación de linfocitos T CD3⁺ vírgenes

Se purificaron linfocitos CD3⁺ mediante selección negativa (para que no se activaran), utilizando un kit específico para ello [Dynabeads® Mouse pan B (B220) Invitrogen]. Se extrajeron el bazo y los ganglios linfáticos (axilares, inguinales, mesentéricos y cervicales) de ratones C57Bl/6 de unos 3 meses de edad y se disgregaron en un filtro de 40 μ m de poro (BD Falcon). Las células obtenidas se centrifugaron en un gradiente de densidad (Lympholyte®-M; Cedarlane) a 2700rpm 20 minutos y sin freno a 22°C. Después, se recogió la interfase, que contiene los linfocitos, y tras lavarla se incubó con las microesferas magnéticas del kit antes mencionado durante 20 minutos a 4°C en agitación. Pasado este tiempo se utilizó el imán (DynaMag™-2; Magnetic Particle Concentrator; Invitrogen) para separar las microesferas magnéticas de los linfocitos CD3⁺. Por último se comprobó la eficiencia de la purificación mediante citometría de flujo marcando las células obtenidas con un anticuerpo anti-CD3 APC.

6.2. Purificación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes

La purificación de los linfocitos T CD4⁺ se llevó a cabo mediante selección negativa y utilizando un kit específico para ello (MACS® Miltenyi Biotec, CD4⁺ T cell Isolation). Se extrajeron el bazo y los ganglios linfáticos (axilares, inguinales, mesentéricos y cervicales) de ratones OT2 de unos 3 meses de edad y se disgregaron en un filtro de 40µm de poro (BD Falcon), las células obtenidas se incubaron con un cóctel de anticuerpos (α -CD8a, α -CD11b, α -CD11c, α -CD19, α -CD45R, α -CD49b, α -CD105, α -MHC II, α -Ter-119) marcados con biotina, en la concentración indicada en el kit, durante 10 minutos a 4°C. Después, se incubó con microesferas magnéticas marcadas con un anticuerpo anti-biotina durante 15 minutos a 4°C. Para llevar a cabo la separación de los linfocitos T CD4⁺ del resto de células, la mezcla se pasó por una columna (MACS® Separation Columns), recogiendo el eluido que contenía los linfocitos T CD4⁺ y se comprobó la eficiencia de la purificación mediante citometría de flujo marcando las células obtenidas con un anticuerpo anti-CD4 FITC.

6.3. Purificación de células dendríticas derivadas de monocitos obtenidos de médula ósea

Los monocitos se obtuvieron extrayendo la médula ósea de los fémures y tibias de ratones C57Bl/6 (3-6 meses de edad) haciendo pasar medio RPMI suplementado con 10% FBS, glutamina 2mM, sodio piruvato 1mM y β -mercapto 50µM a través del canal medular de los huesos. Las células obtenidas se centrifugaron a 1640rpm, 5 minutos a 4°C y se contaron las células del pellet para diluirlas a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml del RPMI antes utilizado. A este medio se añadió un volumen del 10% del sobrenadante del cultivo de las células J558 (línea procedente de un mieloma de linfocitos B de ratón), que producen GM-CSF (20ng/ml aproximadamente). Para diferenciarlas a células dendríticas se recogió el sobrenadante y las células se volvieron a diluir a $0,5 \times 10^6$ /ml cada tres días, hasta el día 8. En este momento ya se encuentran diferenciadas en células dendríticas, se contaron de nuevo y se diluyeron a 10^6 /ml y se incubaron con LPS (Sigma) para su maduración a una concentración de 1µg/ml durante 16 horas en el incubador. La eficiencia de la purificación y de la maduración de las células dendríticas fue determinada por citometría de flujo, empleando CD11c FITC para la eficiencia de la purificación, y CD80 PE, CD86 PE, IA/IE FITC (MHC II) y CD54 Biotinilado (ICAM-1) para comprobar la maduración.

7. Nucleofección de linfocitos T vírgenes

La disminución de la expresión de JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2 y CXCR4 en los linfocitos T CD3⁺ y CD4⁺ se llevó a cabo mediante un proceso de nucleofección. Para este fin se utilizó el kit Amaxa™ Mouse T Cell Nucleofector™ Kit de Lonza y ARN de interferencia pequeño (ARNip). En el caso de los ARNip de JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2 y CXCR4 se trata de una mezcla de 4 secuencias de ARNip (Tabla 4). La concentración final de ARNip utilizados para la nucleofección es de 2µM por cada 3×10^6 de linfocitos T resuspendidos en 100µl de solución de nucleofección por cubeta y se utilizó el programa X-01 del aparato de nucleofección (Amaxa Biosystems). Las células estuvieron 24 horas en el incubador en medio para células primarias suplementado según las especificaciones del kit (IL-7). Como control se utilizó un ARNip no codificante (ON-TARGETplus Non-targeting Pool).

Tabla 4. Relación de ARN de interferencia pequeños (ARNip) empleados.

ARNip	Secuencia	Casa Comercial
JAK1 ON-TARGETplus Mouse Jak1 siRNA-Smartpool	GAAAAUGAAUUGAGUCGAU	Dharmacon
	GAAAUACCCACAUGUAA	
	CGCAUGAGGUUCUACUUUA	
	GCACAGGGACAGUAUGAUU	
JAK2 ON-TARGETplus Mouse Jak2 siRNA-Smartpool	AAUAGGAGACUUCGGAUUA	Dharmacon
	GAAUUGUAAACUGUCCAUA	
	GAACUUAGCUCAUUAAG	
	GAAUUUAUGCGAAUGAUUG	
Tyk2 ON-TARGETplus Mouse Tyk2 siRNA-Smartpool	UGACAGAAUUCGUAGAACA	Dharmacon
	GAACCUCUAUUUUCGAAUG	
	CAAGGACCAUGUGUAUGA	
	CCUGAUGGAUCCGUUUGUA	
CXCR4 ON-TARGETplus Mouse CXCR4 siRNA-Smartpool	GAACCGAUCAGUGUGAGUA	Dharmacon
	GUGUAAGGCUGUCCAUAUC	
	GUGUUCAAUCCAGCAUA	
	AAACGUCCAUUUCAUAGG	

8. Formación de conjugados

8.1. Conjugados de linfocitos T CD4⁺ y células dendríticas

Las células dendríticas derivadas de monocitos se cargaron con el péptido específico de la ovoalbúmina (OVA) 323-339 cuya secuencia es ILE-SER-GLN-ALA-VAL-HIS-ALA-ALA-HIS-ALA-GLU-ILE-ASN-GLU-ALA-GLY-ARG (Gen Script RP10610) a una concentración de 10µg/ml durante 30 minutos en el incubador en medio de depleción y pasado este tiempo se lavaron con medio completo para células primarias.

La formación de los conjugados se realizó poniendo en contacto células T CD4⁺ con células dendríticas cargadas con el péptido de OVA 323-339 en un ratio 1:5 en medio completo para células primarias, se centrifugaron a 800rpm 3 minutos, para facilitar los contactos entre los dos tipos celulares, y se mantuvieron en el incubador durante 30 minutos.

8.2. Conjugados de linfocitos T CD4⁺ y microesferas de látex

8.2.1. Preparado de las microesferas de látex (en condiciones estériles)

Antes de tapizar, las microesferas de látex (Latex Beads, styrene divinylbenzene, 6.4 µm mean particle size. Sigma Aldrich) se lavaron dos veces mezclando 100µl de las microesferas con 900µl de tampón carbonato (8,4mg/ml de bicarbonato sódico y 3,44mg/ml de carbonato sódico filtrado para usar en esterilidad) y se centrifugaron a 3500rpm 3 minutos.

La mitad de las microesferas se tapizaron con el anticuerpo anti-CD3 (hámster Armenian anti-ratón CD3ε, clon 2C11, producido en el laboratorio del Dr. F. Sánchez -Madrid) a una concentración de 10µg/ml y la otra mitad con la misma concentración del anticuerpo de isotipo del anti-CD3 (Purified Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl Antibody, BioLegend) ambos anticuerpos se diluyeron en 250µl BSA al 5% en PBS y se incubaron durante 16 horas a 4°C en agitación. Pasado este tiempo, las microesferas tapizadas con el anticuerpo anti-CD3 o con el anticuerpo de isotipo se lavaron por separado del mismo modo que la primera vez y se bloquearon con 250µl BSA al 5% en PBS durante 1 hora a 4°C en agitación. Después se centrifugaron a 3500rpm 3 minutos, se resuspendieron en 100µl en medio RPMI incompleto y se contaron. Finalmente, se comprobó por citometría de flujo que las microesferas se habían tapizado correctamente empleando un anticuerpo secundario marcado con FITC que reconocía el anti-CD3 con el que habíamos tapizado.

8.2.2. Formación de los conjugados

Los conjugados se formaron entre microesferas tapizadas con anti-CD3, para desencadenar la formación de la sinapsis inmunológica, o con el anticuerpo de isotipo como control, con los linfocitos T CD4⁺ vírgenes purificados anteriormente siguiendo un ratio 1:1. Se centrifugaron a 500rpm durante 1 minuto y se añadió o no CXCL12 (PeproTech) a una concentración de 50nM. Durante 30 minutos se mantuvieron en el incubador y posteriormente los conjugados formados se depositaron sobre cubres previamente tapizados con poli-L-lisina (50µg/ml) para realizar las inmunofluorescencias.

9. Citometría de flujo

9.1. Marcaje de proteínas extracelulares:

Se depositaron 2×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en V. Las células se centrifugaron a 1200 rpm 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 50µl/pocillo de PBS-marcaje y se incubaron con el anticuerpo primario en la concentración adecuada durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron añadiendo 150µl/pocillo de PBS-marcaje y se centrifugaron a 1200 rpm 5 min a 4°C. En los casos en los que el anticuerpo primario no estaba marcado con un fluorocromo fue necesario incubar con un anticuerpo secundario que si estuviera marcado; para ello las células se resuspendieron en 50µl/pocillo de PBS-marcaje y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente y a su concentración indicada durante 30 min a 4°C. Posteriormente las células se lavaron en las mismas condiciones que el anticuerpo primario.

9.2. Marcaje de proteínas intracelular:

9.2.1. Marcaje de p-Tyr

Se formaron conjugados siguiendo el procedimiento explicado en el punto 8.1 y una vez pasados 5 y 30 minutos se pusieron a 4°C para parar la señalización desencadenada. Se repartieron los conjugados en una placa de 96 pocillos de fondo en V poniendo 2×10^5 en 200µl por pocillo y se centrifugaron a 1200rpm 5 minutos a 22°C, descartando el sobrenadante. Después, las células se fijaron con PFA al 4% durante 10 minutos a 4°C. Para poder realizar el marcaje intracelular fue necesario permeabilizar las células con una solución de saponinas al 0,1% durante 10 minutos a 22°C. Posteriormente se incubó el anticuerpo pri-

mario anti-pTyr (4G10) durante 15 minutos a 22°C y posteriormente se incubó el anticuerpo secundario (anti-ratón PE) durante 30 minutos a 22°C. Después de cada paso se realizó un lavado añadiendo a cada pocillo 200µl de PBS y centrifugando a 1200rpm 5 minutos a 22°C, descartando el sobrenadante.

Una vez terminado este tipo de marcaje se pasó a realizar el marcaje extracelular con un anticuerpo anti-CD3 APC para poder seguir así los linfocitos T, según el protocolo explicado en el punto 9.1.

9.2.2. Marcaje de actina polimerizada

Se realizó una cinética de activación de los linfocitos T CD3⁺ y las células se repartieron en una placa de 96 pocillos en V poniendo 2x10⁵ células por pocillo. Las células se fijaron y permeabilizaron igual que en el punto 9.2.1 y se realizó el marcaje de la actina polimerizada mediante el uso de la faloidina-Alexa488 (Invitrogen, 1:1000), que se incubó durante 15 minutos a 22°C. Se realizó un lavado con 200µl de PBS por pocillo y se centrifugaron a 1200rpm 5 minutos a 22°C.

En todos los casos como paso final, las células se resuspendieron en 400µl/punto del PBS-marcaje y se analizó la fluorescencia unida a las células por citometría de flujo mediante el citómetro Cytomics FC 500 o Gallios™ (Beckman Coultery).

Las células se clasificaron por tamaño y complejidad en función de la dispersión producida por las células al pasar por el detector. Se adquirieron eventos suficientes de la población de células vivas para obtener una muestra representativa de la población. El porcentaje de células positivas fue el resultado de la substracción de la fluorescencia de las células marcadas con el anticuerpo control del mismo isotipo que el anticuerpo específico. Los resultados fueron analizados con los programas FlowJo y Kaluza.

10. Inmunofluorescencia

Se tapizaron cubres de cristal con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 50µg/ml durante 16 horas a 4°C. En cada cubre se depositaron 50µl de PBS con 2x10⁵ células durante 30 minutos a 37°C y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 10 minutos a 37°C. Después, se permeabilizó (en los casos que haya sido necesario) 10 minutos con Triton X-100 al 0,2% en TBS a 37°C. Posteriormente, se bloquearon las uniones inespecíficas que pudieran producirse de los anticuerpos durante 1 hora a 37°C con el tampón de bloqueo (suero de cabra al 0,1%, BSA al 1% en TBS). A continuación, se incubaron los anticuerpos primarios durante 1 hora y 30 minutos a 37°C diluyendo los anticuerpos a la concentración adecuada en el tampón de bloqueo. Por último, se incubaron los anticuerpos secundarios y la faloidina-Alexa 488 (1:1000, Invitrogen), durante 45 minutos a 37°C. Después de cada paso se realizaron al menos 5 lavados con TBS.

Como control siempre se emplearon preparaciones únicamente marcadas con los anticuerpos secundarios.

Las preparaciones se montaron sobre portas de cristal y se empleó como líquido de montaje Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc.). Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 meta y las imágenes tomadas se analizaron con el programa Photoshop CS5 o con ImageJ64.

11. Inmunohistoquímica

Se realizó sobre cortes de 8µm de ganglios poplíteos, previamente extraídos y conservados por separado en OCT™ (Tissue-Tek®). Los cortes se fijaron con acetona al 100% durante 10 minutos a 22°C. Después, se bloquearon con suero de cabra al 10%, BSA al 1% y Tween-20 al 0,05% en PBS durante 1 hora a 22°C. Se incubó el anticuerpo monoclonal anti-B220 en el tampón descrito en el paso anterior durante 16 horas a 4°C y pasado este tiempo las preparaciones se lavaron con PBS y se incubó el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa-647 y el anticuerpo monoclonal Alexa633-anti-PNAd durante 60 minutos a 37°C. Para terminar, las preparaciones se montaron sobre portas de cristal empleando el líquido de montaje Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc.) y se analizaron con un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) y con el programa Photoshop CS5.

12. Preparación de muestras para Western Blot

12.1. Lisados celulares

El lisado de las células se realizó con un tampón RIPA [Tris-HCl 50mM pH 7,6, desoxicolato sódico 0,25% (Sigma-Aldrich), Igepal 1% (Sigma-Aldrich), NaCl 150mM y EDTA 1mM] al que se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas [ortovanadato sódico 1mM, aprotinina 10µg/ml, leupeptina 10µg/ml, NaF 25mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM] durante 30 minutos a 4°C en agitación. Posteriormente, se centrifugó a 14000rpm 15 minutos a 4°C y se cuantificó la cantidad de proteína mediante el método del ácido bicinconínico (BCA, Thermo Scientific).

12.2. Inmunoprecipitación

Para preparar la agarosa [anti-Rabbit IgG-agarosa (Sigma)] específica para el anticuerpo con el que vamos inmunoprecipitar se incubó con BSA al 0,5% en PBS durante 15 minutos a 4°C en agitación y tras centrifugarla (3000rpm 5 minutos a 4°C) se resuspendió en el tampón empleado para la lisis. Después, pusimos en contacto la agarosa con nuestro lisado, para disminuir al máximo las uniones inespecíficas, durante 1 hora a 4°C y en agitación; pasado este tiempo se centrifugó 1 minuto a 14000rpm a 4°C y se recogió el sobrenadante. A continuación, incubamos 50µg de proteína de nuestro lisado con el anticuerpo anti-p-Tyr con el que vamos a inmunoprecipitar durante 16 horas a 4°C y en agitación. Tras este tiempo, las muestras se incubaron con 30µl de la agarosa preparada el día anterior durante 1 hora a 4°C y en agitación. Pasado este tiempo las muestras se centrifugaron 1 minuto a 14000rpm y a 4°C y se descartó el sobrenadante. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) y se resuspendieron en tampón de Laemmli para pasar a realizar la separación electroforética.

12.3. Western blot

Para realizar la electroforesis se emplearon geles de poliacrilamida al 8% o al 12% en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) partiendo de al menos 50µg de proteína por pocillo. Una vez separadas las proteínas por tamaño, se procedió a su transferencia a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond™, ECL). Tras el lavado de la membrana con TBS, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon durante 1h a 22°C con TBS-leche desnatada al 5%. Una vez bloqueadas las membranas se incubaron 16 h a 4°C y en agitación constante con el anticuerpo específico para la proteína a estudiar en TBS-leche al 2,5 %. Tras la incubación con el anticuerpo primario,

se lavaron las membranas 3 veces con agua destilada, 3 veces con Tween 20 al 0,1 % en TBS, seguido de 3 lavados con agua destilada. Las membranas se incubaron 45 minutos a 22°C con el anticuerpo secundario, fusionado a la peroxidasa, que reconocía específicamente el anticuerpo primario, en TBS-leche al 2,5%. Para la detección final de la proteína de interés en la membrana, ésta se incubó con ECL (protein detection kit, Healthcare-GE) 1 minuto a 22°C. La señal luminiscente producida se detectó por exposición de una película fotográfica (Konica Minolta) a la membrana de nitrocelulosa y posterior revelado de la película. La cuantificación se llevó a cabo escaneando las películas y analizando las bandas de proteína obtenidas con el programa ImageJ64.

13. Aislamiento de ARN total

Para llevar a cabo el aislamiento de ARN a partir de linfocito T CD3⁺ y CD4⁺ se empleó un kit comercial (RNeasy micro, Quiagen) debido al bajo número de células recuperadas tras la nucleofección. Los linfocitos se centrifugaron a 1200rpm 5 minutos y se descartó el sobrenadante previo paso al uso del kit mencionado.

14. Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis del ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit Super Script First strand DNA synthesis (Invitrogen) que emplea el método de la retrotranscriptasa, que sintetiza ADN a partir de una hebra de ARN. Para la síntesis del ADNc, se utilizó la misma cantidad de ARN total de las distintas muestras de un mismo experimento (entre 0,25 y 1µg de ARN) y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Como control de pureza del ARN total, se llevó en paralelo un control negativo de la síntesis de ADNc de las mismas muestras, pero sin retrotranscriptasa, y se comprobó la ausencia de contaminación con ADN genómico por PCR convencional.

15. PCR cuantitativa o Q-PCR

Se realizó utilizando como método de detección de amplificación la sonda el SYBR-green. Estos experimentos se realizaron con un kit comercial según las recomendaciones del fabricante [Power SYBR Green PCR Master mix (2x), Applied Biosystems]. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador a tiempo real (7900 Real-Time PCR System; Applied Biosystems) en las siguientes condiciones: paso 1 (95°C y 10 min) y paso 2 (95°C, 15 segundos seguido de 60°C, 1 min; 40 ciclos). Los resultados se expresaron como veces de inducción (RQ) calculando la diferencia de ciclos entre distintos tratamientos de muestras ya normalizadas ($\Delta\Delta C_t$). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se encuentran en la **tabla 5**. Como control se emplearon los resultados obtenidos con la b-actina.

16. Ensayos de migración en transwell

Para estudiar la capacidad migratoria de los linfocitos T en respuesta a gradientes quimiotácticos, se realizaron ensayos de trans migración en cámaras de Boyden (Transwell Permeable Supports; CORNING) que poseen una membrana porosa de 3µm que fue tapizada con ICAM-1-Fc, una quimera recombinante de ratón, a una concentración de 2µg/ml en PBS, durante 16 horas y a 4°C (R&D SYSTEMS®). Las quimioquinas empleadas fueron CXCL12 (PeproTech) y CCL21 (PeproTech) a una concentración de 50nM y 200nM respectivamente. En cada pocillo de la placa se pusieron 600µl medio

de depleción con la quimioquina de estudio y en la parte superior de la membrana porosa se depositaron 2×10^5 de linfocitos en 100 μ l de medio de depleción. La placa se dejó entre 2 y 3 horas en el incubador y pasado este tiempo se recogió el medio del pocillo que contenía la quimioquina y se cuantificó el número de células presentes en el mismo empleando un citómetro de flujo (Cytomics FC 500) y se estableció el porcentaje de células que migraron respecto al número de células totales (Rodríguez-Frade et al. 2009).

Tabla 5. Relación de oligonucleótidos empleados.

Gen	Sentido	Secuencia
jak1	5'	TGA GCT TTG ATC GGA TCC TT
	3'	GCA GGG TCC CAG AAT AGA TAT G
jak 2	5'	GAA CCT ACA GAT ACG GAG TGT CC
	3'	CAA AAT CAT GCC GCC ACT
jak 3	5'	CAC AGT GCA TGG CCT ATG AT
	3'	AGG TGT GGG GTC TGA GAG G
cxcr4	5'	CCA TGG AAC CGA TCA GTG TG
	3'	TTT TCA TCC CGG AAG CAG G
il-2	5'	CACTTCAAGCTCTACAGCGGA
	3'	AAAATTTGAAGGTGAGCATCC
Cxcl12	5'	AGC CAA CGT CAA GCA TCT GA
	3'	TCG GGT CAA TGC ACA CTT GT
m- β -actina	5'	GGC ACC ACA CCT TCT ACA ATG
	3'	TGG ATG GCT ACG TAC ATG GCT

17.Migración “in vivo”

Los linfocitos T CD3⁺ vírgenes previamente purificados y nucleofectados se marcaron con diferentes colorantes vitales, los linfocitos sin nucleofectar se marcaron con CMAC (Cell Tracker™ Blue Dye; Invitrogen), los deficientes para JAK1 y JAK2 con CMTMR (CellTracker™ Orange CMTMR Dye; Invitrogen) y los nucleofectados con el ARNip control con CMFDA (CellTracker™ Green CMFDA Dye; Invitrogen). Una vez marcados se mezclaron según un ratio 1:1:1 hasta un total de 2×10^7 linfocitos en 200 μ l de PBS estéril y se inyectaron por vía intravenosa en un ratón C57Bl/6. Tras 6 horas se prepararon los ganglios poplíteos (PLN) como se describe en este papel (Soriano et al. 2011) con el ratón anestesiado y 20 minutos antes de comenzar a grabar se inyectó por vía intravenosa 15–20 μ g del anticuerpo Alexa633-Meca-79 para poder localizar las HEV. El microscopio multifotón está formado por un microscopio de fluorescencia Olympus BX50WI con un objetivo 20X, un sistema TrimScope 2PM y es controlado con el programa Inspector (LaVision Biotec). El análisis del movimiento de los linfocitos se llevó a cabo con el programa Velocity (Improvision).

18. Ensayos de adhesión

Realizamos 3 tipos de ensayos de adhesión distintos para estudiar bajo diferentes condiciones la capacidad de adhesión de los linfocitos T CD3⁺ previamente purificados y nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 o de los linfocitos T CD4⁺.

18.1. Estáticas

Los linfocitos T CD3⁺ nucleofectados o los linfocitos T CD4⁺ a una concentración de 10^7 /ml en PBS se marcaron con la sonda CellTrace™ CFSE (Invitrogen) (4mM) durante 10 minutos en el baño a 37°C, pasado este tiempo se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1200rpm 5 minutos. Previamente tapizamos durante 16 horas a 4°C una placa de 96 pocillos de fondo plano con distintos sustratos según cada condición: ICAM-1-Fc a 2 µg/ml (R&D SYSTEMS®) y/o anti-CD3 (1µg/ml, CD3ε purificado, mAb 2C11, BD Pharmigen™). Después, se tapizó con las quimioquinas CXCL12 (1µg/ml, PeproTech) o CCL21 (1µg/ml, PeproTech) durante 60 minutos a 37°C. Los linfocitos se distribuyeron a una concentración de 3×10^5 /200µl en medio de depleción por pocillo y tras dar un pulso a la placa se mantuvo en el incubador durante 10 minutos. Después, se descartó el sobrenadante y la placa se lavó 3 veces con PBS añadiendo este tampón con mucho cuidado y moviendo suavemente la placa para posteriormente desechar el sobrenadante. Finalmente, se añadieron 200µl de PBS por pocillo y se midió la fluorescencia de la placa a 535nm en un EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Para calcular el número de células adheridas realizamos una curva patrón con un número conocido de células marcadas con el CFSE y extrapolamos la absorbancia de nuestras muestras.

18.2. En flujo

Tapizamos placa de Petri con o sin CXCL12 o CCL21 (2µM) durante 90 minutos a 37°C. Después, bloqueamos las uniones inespecíficas con BSA al 2,5% en PBS durante 60 minutos a 37°C y pasado este tiempo se tapizó con ICAM-1-Fc (R&D SYSTEMS®) a una concentración de 6µg/ml durante 16 horas a 4°C en una cámara húmeda. Se realizaron dos lavados de las zonas tapizadas con PBS y se bloqueó con 200µl FBS 15 minutos a 37°C. La placa de Petri tapizada, se incorporó a la cámara de (flujo flow chamber, IQUUM), previamente atemperada a 37°C y se colocó en un microscopio Olympus Fluoview 1000 conectada a una cámara (Cohu). Inyectamos durante 2 minutos 10^6 de linfocitos/ml en un flujo de 1 dina/cm² (0.204 ml/min), y tras este tiempo el flujo se paró durante 10 minutos para que los linfocitos T se adhirieran, y después se reinició el flujo empezando en 0.25 dinas/cm²/min y aumentando hasta 2 dinas/cm². Todo el proceso se grabó para después cuantificar los linfocitos que se mantenían adheridos. El resultado del experimento se expresó como un porcentaje entre el número de linfocitos adheridos y el número de linfocitos total por campo (Mellado et al. 2008).

18.3. Bicapas lipídicas

Este ensayo de adhesión se llevó a cabo sobre bicapas lipídicas artificiales planas en cámaras de flujo cerradas FCS2. Estas bicapas se formaron mezclando el lípido 1,2-dioleoyl-fosfatidilcolina (DOPC) (Avanti Polar Lipids, Inc.) con liposomas de DOPC que contenían ICAM-1 o VCAM-1 de ratón anclados por glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (150 moléculas/µm²). Las bicapas se montaron sobre cristales previamente tratados con solución sulfocrómica durante 20 minutos a 22°C y se bloquearon durante 60 minutos a también a 22°C con FBS al 2% en PBS. Después, las membranas se incubaron o no con CCL21 o CXCL12 (Peprotech) a 100nM durante 30 minu-

tos a 22°C. Se inyectaron 5×10^6 de linfocitos T nucleofectados diluidos en 1 ml de FBS al 0.5%, Cl_2Mg 2mM, Cl_2Ca 0.5mM y D-glucosa 0.5 g/l en PBS en cada cámara previamente atemperada a 37°C. Cuando fue necesario los linfocitos fueron pre-tratados con el anticuerpo anti-CD3 ϵ (1 μm /ml) durante 30 minutos a 37°C. Las imágenes se empezaron a adquirir pasados 10 minutos de la inyección de los linfocitos con un microscopio Zeiss Axiovert LSM 510-META y se analizaron con el programa ImageJ64. El número de linfocitos adheridos se determinó analizando cuales eran IRM (*Interference Refelction Microscopy*) positivos, y se estableció un porcentaje respecto al número de linfocitos totales en el campo analizado (Saez de Guinoa et al. 2011).

19. Ensayos de polarización de linfocitos T vírgenes

Los linfocitos T CD3⁺ purificados previamente se recogieron y centrifugaron a 1200rpm 5 minutos a 22°C y se resuspendieron en medio de depleción durante 2 horas en el incubador. Pasado este tiempo se recogieron y centrifugaron a 1200rpm 5 minutos a 22°C y se resuspendieron a una concentración de $10^6/500\mu\text{l}$ de medio de depleción y se estimularon durante 15 minutos con CXCL12 (PeproTech) a 50nM a una temperatura de 37°C y en agitación suave. Una vez terminado el tiempo de estimulación, las células se lavaron con medio de depleción y se centrifugaron a 1200rpm 5 minutos a 22°C. El pellet se resuspendió en medio de depleción a una concentración de $2 \times 10^5/50\mu\text{l}$ y se distribuyeron en cubres de cristal previamente tapizados con fibronectina a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 16 horas a 4°C. Las células se depositaron durante 30 minutos a 37°C y a partir de aquí realizamos una inmunofluorescencia como se describe en el paso 10, empleando un anticuerpo anti-CD44 Biotinilado como marcador del urópodo y faloidina-Alexa488 (Invitrogen, 1:1000), para marcar la actina polimerizada. Este experimento se cuantificó con el programa ImageJ64 y establecimos un porcentaje entre el número de linfocitos T polarizados en función de la localización del marcaje con el anticuerpo anti-CD44 y de la actina polimerizada, y el número de linfocitos total presente en el campo.

20. Ensayos de activación y proliferación de linfocitos T mediante formación de conjugados

Estos dos ensayos se realizaron en paralelo y para llevarlos a cabo se formaron conjugados en placas de 96 pocillos de fondo en U poniendo en contacto células T CD4⁺ con células dendríticas cargadas con el péptido de OVA 323-339 en un ratio 1:5. Los conjugados se distribuyeron a una concentración de 2×10^5 en 200 μl medio completo por pocillo y se mantuvieron en el incubador durante 12, 24 o 48 horas. Una vez pasado este tiempo, se realizó el marcaje extracelular siguiendo el procedimiento descrito en el punto 9.1. En ambos casos para seguir únicamente la activación y proliferación de los linfocitos T, usamos el anticuerpo anti-CD3 APC.

Como marcadores de activación de los linfocitos T se emplearon los anticuerpos anti-CD25 PE y anti-CD69 PE.

En el caso de la proliferación, previo paso a la formación de los conjugados, los linfocitos T fueron marcados con la sonda CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit (molecular probes by *life technologies*™) a una concentración de 0,5mM en PBS y durante 30 minutos en el incubador y posteriormente se lavaron poniéndolos en contacto con FBS (para quitar el excedente de sonda no unida, ya que se une a las proteínas), durante 5 minutos y se centrifugaron a 1200rpm durante 5 minutos.

El AMD3100, al tratarse de un inhibidor reversible, y de un experimento de larga duración, se fue añadiendo nuevamente cada 8 horas.

Finalmente, se analizaron por separado ambos experimentos mediante citometría de flujo. En el experimento de activación se midieron los niveles de expresión de CD25 y/o CD69 y en el experimento de proliferación se midió la disminución de la coloración violeta de los linfocitos, indicativa de su división.

21. Ensayo de producción de IL-2

Los linfocitos T CD4⁺ fueron activados distribuyendo 10⁵ linfocitos en 200 µl de medio para células primarias por pocillo, en una placa de 96 pocillos de fondo plano, que previamente había sido tapizada con anti-CD3 a 1 µg/ml (hámster Armenian anti-ratón CD3ε, clon 2C11, BD Pharmingen™) más anti-CD28 a 2 µg/ml (hámster monoclonal, Sigma-Aldrich™) durante 16 horas a 4°C. Tras el tiempo de activación se recogieron los linfocitos y se congelaron a -80°C para poder realizar la Q-PCR empleada para medir los niveles de IL-2.

22. Cinética de activación de linfocitos T vírgenes con CXCL12 o CCL21

Los linfocitos T CD3⁺ y CD4⁺ purificados previamente se recogieron y centrifugaron a 1200rpm 5 minutos a 22°C y se resuspendieron en medio de depleción, reposando 2 horas en el incubador. Nuevamente, se recogieron y centrifugaron a 1200rpm 5 minutos a 22°C y se resuspendieron a una concentración de 3x10⁶/500 µl de medio de depleción por tiempo y se estimularon a 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 3 minutos, 5 minutos y 10 minutos con CXCL12 (PeproTech) o CCL21 (PeproTech) a 100nM a 37°C y en agitación. La estimulación se detuvo con PBS a 4°C y las células se centrifugaron a 1200rpm 5 minutos a 4°C.

Después realizamos un Western Blot o una inmunoprecipitación según se describe en el punto 12.

23. ELISA detección RhoA activado [G-LISA® RhoA Activation Assay Biochem Kit™ (Absorbance Based)]

Realizamos una cinética de activación con CXCL12 (PeproTech) 100nM en linfocitos T CD4⁺ como se indica en el punto 22, y para llevar a cabo la detección de RhoA activado tras la estimulación se empleó este kit comercial que permite su detección mediante un ELISA de tipo sándwich. Tras la cinética de activación se siguió el protocolo indicado en el kit para llevar a cabo la lisis de los linfocitos, la cuantificación de proteína, la realización del ELISA y su cuantificación e interpretación.

24. Ensayos de videomicroscopía

Con el fin de observar la dinámica de formación de los conjugados recurrimos a esta técnica. Se tapizaron placas de 8 pocillos (1m-Slide 8 well ibiTreat, Microscopy Chamber; ibidi) con fibronectina (10 µg/ml) durante 16 horas a 4°C. Pasado este tiempo los pocillos se lavaron con PBS y se distribuyeron las células poniendo en primer lugar 5x10⁴ células dendríticas derivadas de médula ósea y cargadas con el péptido de OVA 323-339 en 150 µl de medio completo por pocillo. Se dejó que se depositaran durante media hora en el incubador. Colocamos la placa en el microscopio (microscopio de fluorescencia AMI 6000B; Leica), dentro de una cámara que mimetiza las condiciones del incubador y

enfocamos en cada pocillo dos campos, dejando estas posiciones ya marcadas. Después, se añadieron $2,5 \times 10^5$ linfocitos T CD4⁺ en 50 μ l de medio completo y volvimos a enfocar todas las posiciones rápidamente para comenzar a grabar. Se grabó durante 180 minutos, tomando fotos de cada campo cada 30 segundos aproximadamente. Los vídeos obtenidos se analizaron con el programa Adobe Photoshop (CS5) fotograma a fotograma siguiendo cada linfocito T CD4⁺ que ejercía un contacto con una célula dendrítica hasta un total de 100 linfocitos en cada caso y cuantificando así el tiempo que duraba cada contacto.

25. Microscopio de fluorescencia por reflexión total interna [Total Internal Reflection Microscopy (TIRFM)]

Con esta técnica hemos podido hacer una primera aproximación en el estudio de la dinámica del receptor de quimioquinas CXCR4 en la membrana de células Jurkat, sobre bicapas lipídicas tapizadas, en algunos casos, con un anticuerpo anti-CD3 para simular la formación de una sinapsis inmunológica. La línea celular Jurkat fue cedida por el Doctor F. Sánchez-Madrid (CNIC / H. de la Princesa). Estas células se electroporaron (GenePulser X cell™, BIO RAD), poniendo 12×10^6 de células por cubeta con 20 μ g del DNA de la construcción CXCR4-AcGFP. Tras las 24 horas necesarias para la expresión de la proteína, se separaron en un citómetro de *sorting* (BD FACSAria Cell Sorter) las células que presentaban niveles adecuados de la misma, para poder realizar el experimento (Fig. 12).

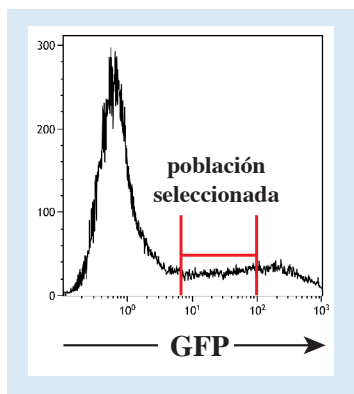


Figura 12. Población seleccionada GFP⁺. Perfil de expresión en membrana de la construcción CXCR4-AcGFP en las células Jurkat electroporadas con el ADN de esta construcción. La selección corresponde a la población elegida para realizar el experimento de TIRFM.

25.1. Generación de la construcción CXCR4-AcGFP

El receptor de quimioquinas CXCR4 se fusionó en fase a la proteína monomérica GFP (CXCR4-AcGFP); para ello amplificamos por PCR con oligos específicos el receptor CXCR4 utilizando como molde el receptor clonado en pcDNA3.1 (isoforma 2, cedido por el Dr. Bernard Moser, Universidad de Cardiff). El fragmento obtenido por PCR de CXCR4 incorpora en sus extremos las dianas de restricción específicas (Tabla 6) para ser clonado en el vector pAcGFP.N1.

Tabla 6. Oligonucleótido empleado en PCR para realizar la construcción CXCR4-AcGFP.

Clonaje	Diana	Secuencia
CXCR4-AcGFP	5' Hindell	5'-ATAAGCTTATGGAGGGGATCAGTATATACATTC-3'
	3' AgeI	5'-GACCGGTGGATCCCGTAAGCTGGAGTGAAAACCTGAAG-3'

25.2. Bicapas lipídicas

Para formar las sinapsis inmunológicas recurrimos a la generación de bicapas lipídicas planas artificiales en cámaras de flujo cerradas FCS2 (Vardhana et al. 2008). Para formar las bicapas se mezclaron los lípidos 1,2-dioleoyl-fosfatidil-colina (DOPC) (Avanti Polar Lipids, Inc.), con liposomas de DOPC que contenían lípidos biotinilados (Avanti Polar Lipids, Inc.) y liposomas de DOPC que contenían ICAM-1 de ratón anclados por glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (150 moléculas/ μm^2). Las bicapas se montaron sobre cristales previamente tratados con solución sulfocrómica (20 minutos, 22°C) y se bloquearon (60 minutos, 22°C) con FBS al 2% en PBS. Para desencadenar la formación de la sinapsis inmunológica las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-CD3 ϵ mono biotinilado (Hámster Armenian, IgG1, 2C11. BD Pharmingen) (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 minutos, 22°C) para tener alrededor de 30 moléculas/ μm^2 . Después, las membranas se incubaron o no con CXCL12 (Peprotech) a 100nM durante 30 minutos a 22°C. Se inyectaron 3×10^6 células Jurkat CXCR4-AcGFP $^{+}$ previamente separadas, diluidos en 1 ml de FBS al 0.5%, Cl_2Mg 2mM, Cl_2Ca 0.5mM y D-glucosa 0.5g/l en PBS en cada cámara previamente atemperada a 37°C. Las imágenes se empezaron a adquirir pasados 5 minutos de la inyección de los linfocitos con un microscopio de TIRF (Leica AM TIRF invertido) equipado con una cámara EM-CCD (Andor DU 897/Andor DU 8285 VP), usando un objetivo 100x de inmersión (HCX PL APO 100x/1.46) y el láser empleado fue el láser de diodo 488nm. Las condiciones para tomar las imágenes fueron: penetrancia de 110nm, potencia del láser del 49%, tiempo de exposición 90ms. Se adquirieron 500 imágenes tomadas cada 98ms.

25.3. Análisis

El análisis de los vídeos obtenidos se realizó en dos pasos. Primero se analizó el *Single Particle Tracking (SPT)* del receptor CXCR4 en la membrana celular. Utilizamos los algoritmos desarrollados por Jaqaman K. y colaboradores (U-Track2) (Jaqaman et al. 2008) y el software matemático Matlab (The Math Works). Y en segundo lugar se analizó la intensidad de las partículas con otro algoritmo desarrollado en colaboración con el Dr. Carlos Óscar Sorzano (CNB/CSIC). Este algoritmo utiliza las coordenadas (X,Y) centrales de la partícula analizada, detectadas en el U-Track2, como referencia para generar una matriz de dimensión 3x3 a lo largo de la trayectoria obtenido un valor promedio de la intensidad (unidades arbitrarias, u.a.).

26. Análisis Estadísticos

Las graficas y análisis estadísticos se realizaron con el software Prims 5.0a (GraphPad). Se aplicaron dos tipos de análisis estadísticos según el tipo de experimento, two-tailed unpaired Student t-test o two-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

VII. Resultados

Resultados

Los receptores de quimioquinas permiten a las células seguir el gradiente quimioatrayente formado por la unión de las quimioquinas a los GAG. Pero además, en el proceso de la extravasación celular, se sabe que las quimioquinas también colaboran en la activación de las integrinas desde el interior celular (activación *inside-out*) que originará una adhesión firme previa al proceso de extravasación. Usando como modelo el proceso homeostático de extravasación a los ganglios linfáticos de los linfocitos T vírgenes, en este primer objetivo nos propusimos analizar la relevancia funcional de las Janus quinasas, en la biología de las quimioquinas. Trabajos anteriores han relacionado a JAK3 en la migración de los linfocitos T vírgenes a los ganglios linfáticos, mediado por CCR7 (Stein et al. 2003). Esta ruta de señalización también se ha asociado a otros receptores de quimioquinas como CCR2, CCR5 y CXCR4 (Vila-Coro et al. 1999, Zhang et al. 2001).

1. Implicación de las Janus quinasas en la migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos

1.1. Purificación y caracterización de linfocitos T CD3⁺ vírgenes

Para llevar a cabo los objetivos de esta tesis se emplearon linfocitos T CD3⁺ vírgenes purificados a partir del bazo y de los ganglios linfáticos [axilares (ALN), inguinales (ILN), y mesentéricos (MLN)] de ratones C57Bl/6 mediante selección negativa. Sólo se emplearon purificaciones con un grado de pureza superior al 95%, que fue medido por citometría de flujo con un anticuerpo específico anti-CD3 (**Fig. 13 A**).

Los linfocitos T vírgenes presentan un fenotipo característico, expresando en su superficie niveles bajos de CD44 (CD44^{bajo}) y altos de la L-selectina (CD62L^{alto}) (Sprent et al. 2011). Además, la falta de expresión de CD69 y CD25 (la cadena α del receptor de la IL-2) (Sakaguchi et al. 1995, de la Fuente et al. 2012) confirman su estado inactivo. Se midió la expresión de estos marcadores con anticuerpos específicos anti-CD44, anti-CD62L (**Fig. 13 B**), anti-CD69 y anti-CD25 por citometría de flujo (**Fig. 13 C**) confirmando el fenotipo virgen e inactivo de los linfocitos CD3⁺ purificados.

Como control de la experimentación posterior se evaluó también la expresión mediante citometría de flujo de CCR7, CXCR4 y LFA-1 (**Fig. 13 D**).

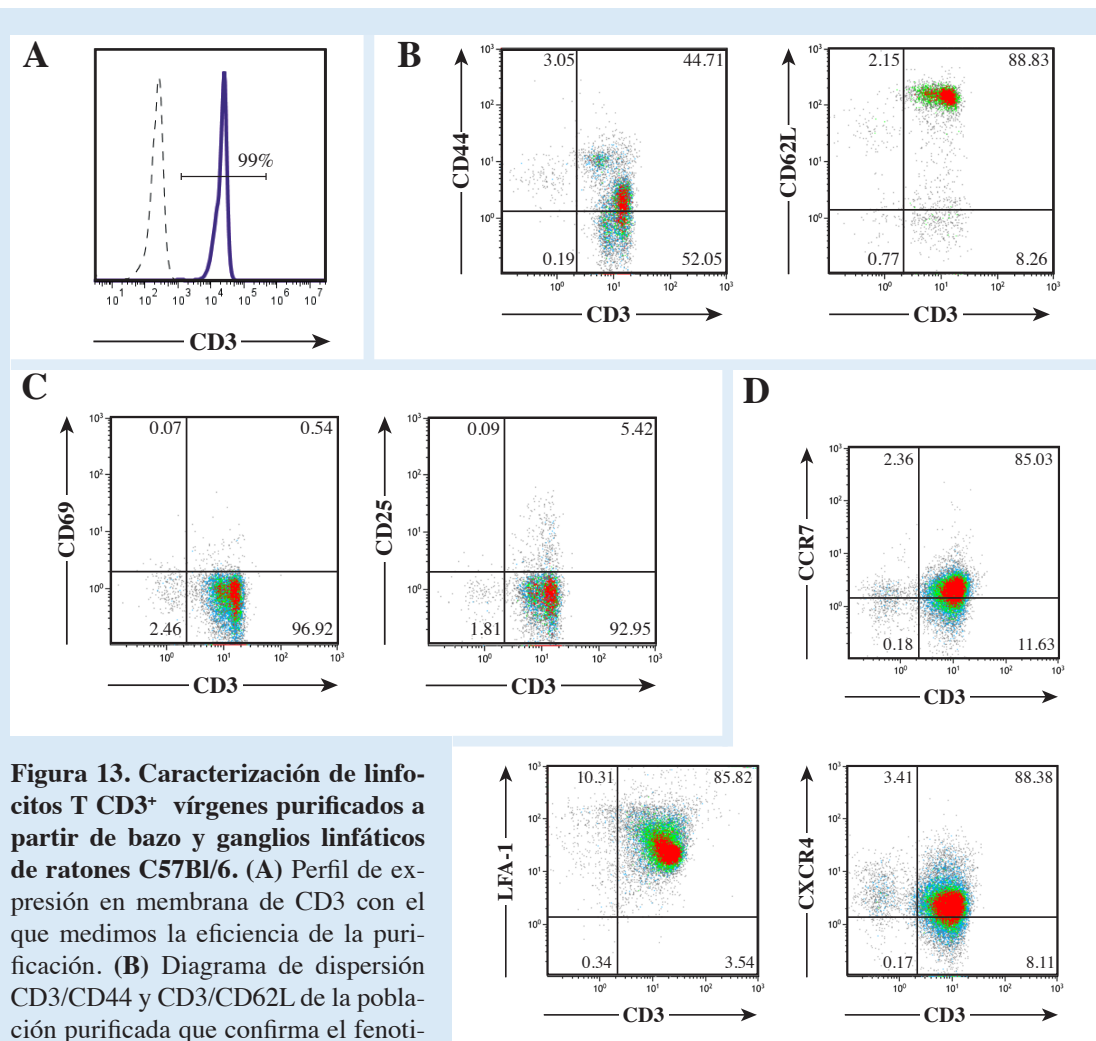


Figura 13. Caracterización de linfocitos T CD3⁺ vírgenes purificados a partir de bazo y ganglios linfáticos de ratones C57Bl/6. (A) Perfil de expresión en membrana de CD3 con el que medimos la eficiencia de la purificación. (B) Diagrama de dispersión CD3/CD44 y CD3/CD62L de la población purificada que confirma el fenotipo virgen. (C) Diagrama de dispersión CD3/CD69 y CD3/CD25 de la población purificada que confirma el fenotipo inactivado (D) Diagrama de dispersión CD3/CXCR4, CD3/CCR7 y CD3/LFA-1 de la población purificada para comprobar su expresión. El perfil de expresión y los diagramas de dispersión corresponden a un experimento representativo.

1.2. Nucleofección y caracterización de los linfocitos T nucleofectados

Los estudios con ratones modificados genéticamente para eliminar las distintas JAK han demostrado que los ratones que no expresan JAK1 mueren 24 horas después del nacimiento (Rodig et al. 1998), los que no expresan JAK2 mueren durante la gestación a causa de un problema en la eritropoyesis (Neubauer et al. 1998) y los deficientes en JAK3 son viables, pero su sistema inmunológico es completamente distinto al que presentan los ratones sin modificar (Thomis et al. 1997a, Thomis et al. 1997b, Thomis et al. 1999). Por esta razón, para el desarrollo de esta tesis empleamos células primarias, en las que redujimos la expresión de JAK1 y JAK2 con un kit comercial específico para este tipo de células (Amaza), y una mezcla de ARN pequeño de interferencia (ARNip) para las Janus quinasas JAK1 y JAK2, usando como control una mezcla de ARNip no codificantes (ON-TARGETplus Nontargeting Pool).

En la incubación posterior durante 24 horas a 37°C, añadimos IL-7 (25U/ml) para mejorar la viabilidad de las células nucleofectadas, que se situó en ~ 63%, tanto en los linfocitos nucleofecta-

dos con la mezcla de ARNip de JAK1 y JAK2 como en los linfocitos nucleofectados con la mezcla del ARNip control. Dado que la IL-7 requiere de la quinasa JAK3 para señalizar y que el compromiso de viabilidad celular nos obligaba a su utilización, en este proyecto centramos nuestro estudio en las quinasas JAK1 y JAK2.

Tras un gradiente de densidades para poder recuperar los linfocitos vivos se cuantificó la expresión de JAK1 y JAK2 mediante Western Blot (**Fig. 14 A**), apreciando que siempre era aproximadamente un 60% menor de su expresión inicial.

Aseguramos entonces mediante citometría de flujo que la nucleofección no alteraba el fenotipo virgen de los linfocitos T (**Fig. 14 B**), ni provocaba su activación (**Fig. 14 C**). También comprobamos que no afectaba a la expresión de los receptores objeto de estudio CCR7 y CXCR4 (**Fig. 14 D**).

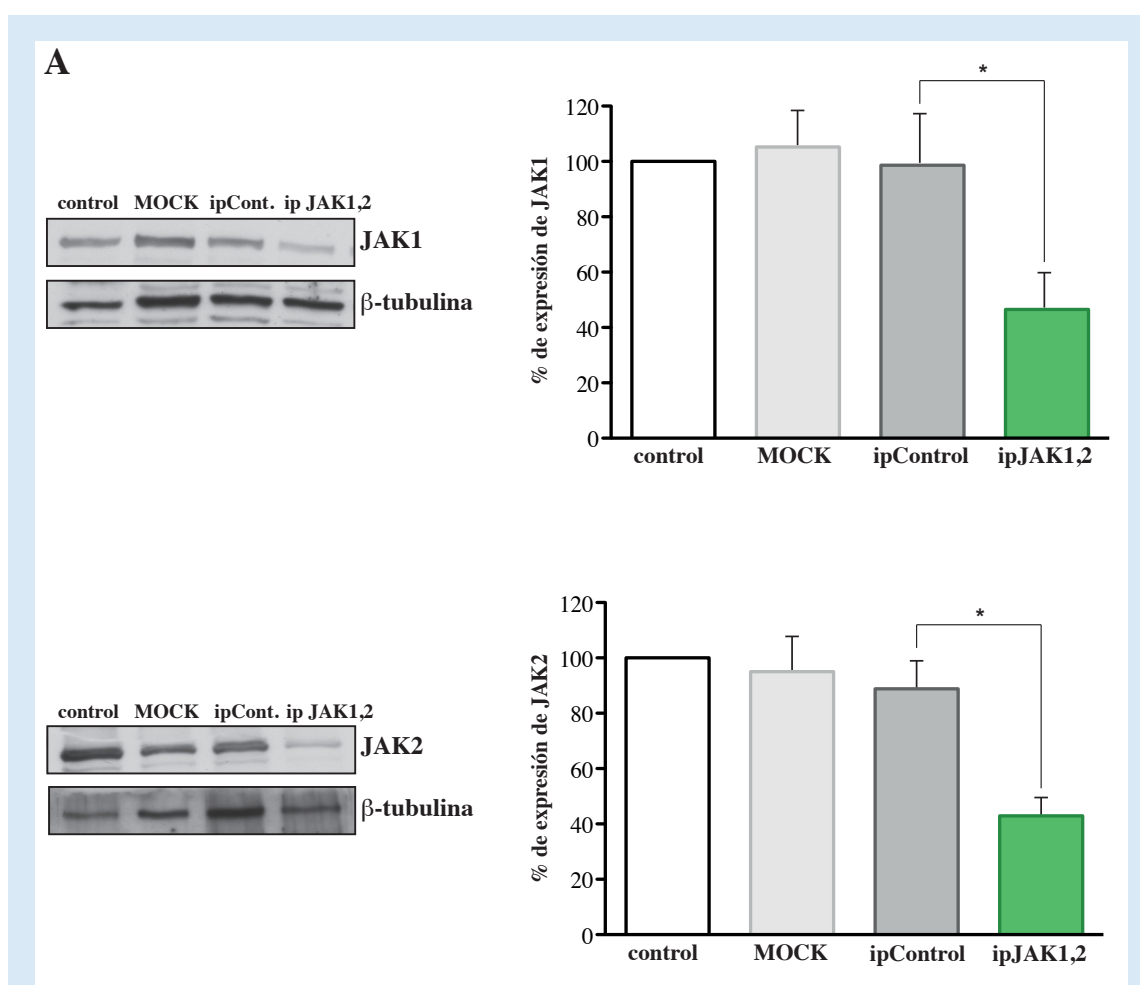


Figura 14. Disminución de la expresión de JAK1 y JAK2 en linfocitos T CD3⁺ nucleofectados y su caracterización. (A) La figura de la izquierda muestra un WB representativo realizado para medir los niveles de expresión de JAK1 en linfocitos T sin nucleofectar (control), en linfocitos T nucleofectados sin ARNip (MOCK), en linfocitos T nucleofectados con ARNip control (ipControl) y en linfocitos T nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (ipJAK1,2). La cuantificación de la expresión de JAK1 se representa en la gráfica de la derecha en forma de porcentaje respecto a la expresión del mismo en los linfocitos control. Lo mismo queda representado para JAK2 en la figura de abajo. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$).

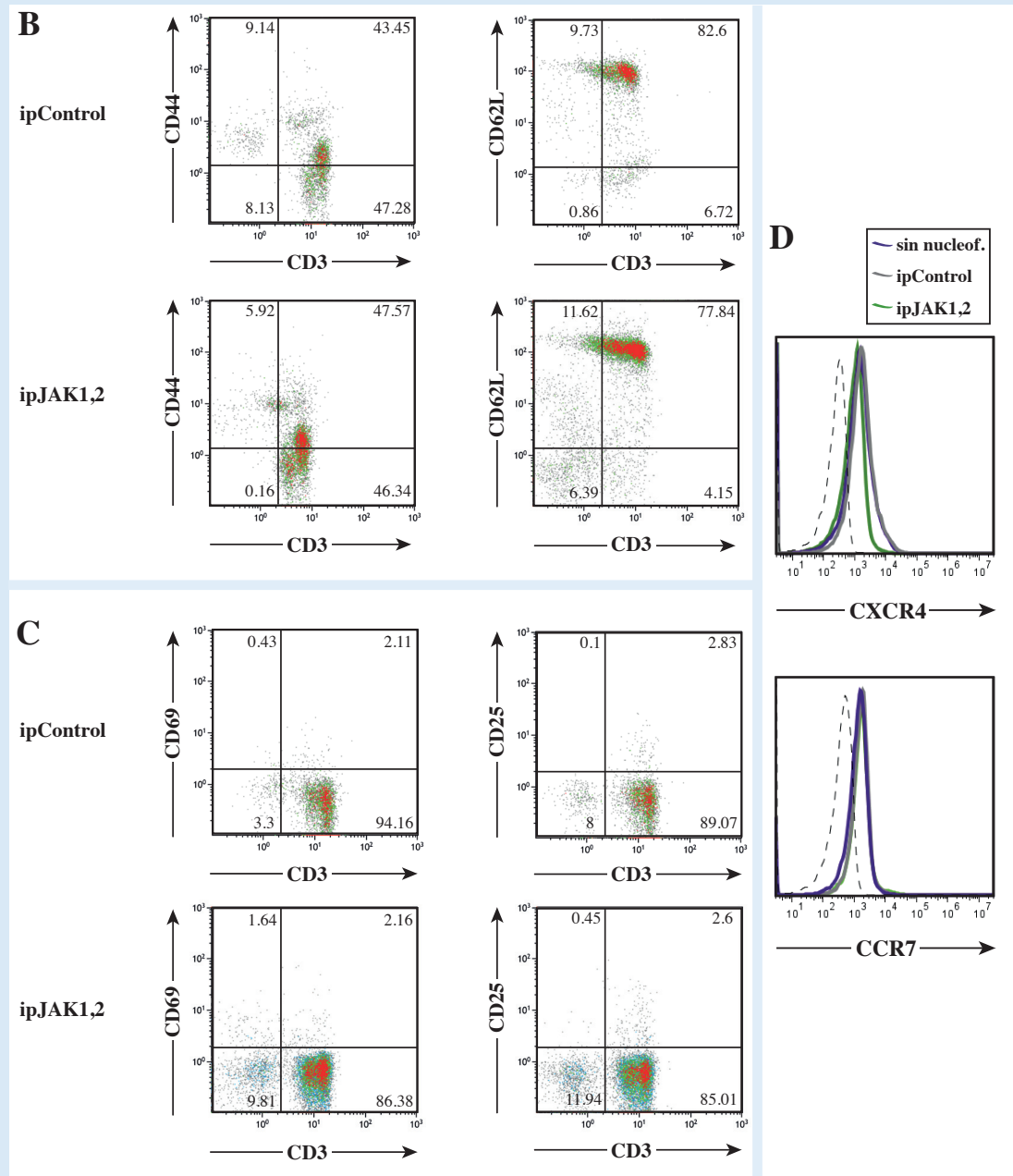


Figura 14. Disminución de la expresión de JAK1 y JAK2 en linfocitos T CD3⁺ nucleofectados y su caracterización. (B) Diagramas de dispersión CD3/CD44 y CD3/CD62L. En la parte superior se encuentran los diagramas correspondientes a los linfocitos T nucleofectados con los ARNip control (ipControl) y en la parte inferior los correspondientes a los linfocitos T nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (ipJAK1,2). **(C)** Diagramas de dispersión CD3/CD69 y CD3/CD25. En la parte superior se encuentran los diagramas correspondientes a los linfocitos T nucleofectados con los ARNip control (ipControl) y en la parte inferior los correspondientes a los linfocitos T nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (ipJAK1,2). **(D)** Perfil de expresión en membrana de CXCR4 y CCR7 de los linfocitos T sin nucleofectar (morado), nucleofectados con los ARNip control (gris) y nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (verde). Los diagramas de dispersión y perfiles de expresión corresponden a un experimento representativo.

1.3. Implicación de las Janus quinasas JAK1 y JAK2 en la migración a los ganglios linfáticos de los linfocitos T vírgenes

1.3.1. Estudio “in vitro”

Una vez conseguido y caracterizado el modelo celular de linfocitos T primarios con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida, estudiamos en primer lugar su movimiento en un ensayo de quimiotaxis in vitro hacia gradientes de CXCL12 50nM o CCL21 100nM, usando para ello cámaras de Boyden (Transwell, Costar) tapizadas con ICAM-1, ligando de la integrina LFA-1. La reducción simultánea de JAK1 y JAK2 provocó una reducción significativa de la migración, en respuesta tanto a CXCL12 como a CCL21, sin embargo, no encontramos diferencias significativas cuando analizamos la migración de los linfocitos en los que se había reducido la expresión de cada JAK por separado (**Fig. 15 A**). Este resultado sugiere que si bien las JAK están implicadas en la señalización activada por CXCL12 y CCL21 en el linfocito T, existe un fenómeno de redundancia que permite compensar la ausencia de una ellas con la otra.

Curiosamente los efectos observados dependían de la presencia de ICAM-1 en el ensayo y desaparecieron al repetir el ensayo con las mismas células pero en ausencia de este ligando de integrinas (**Fig. 15 B**)

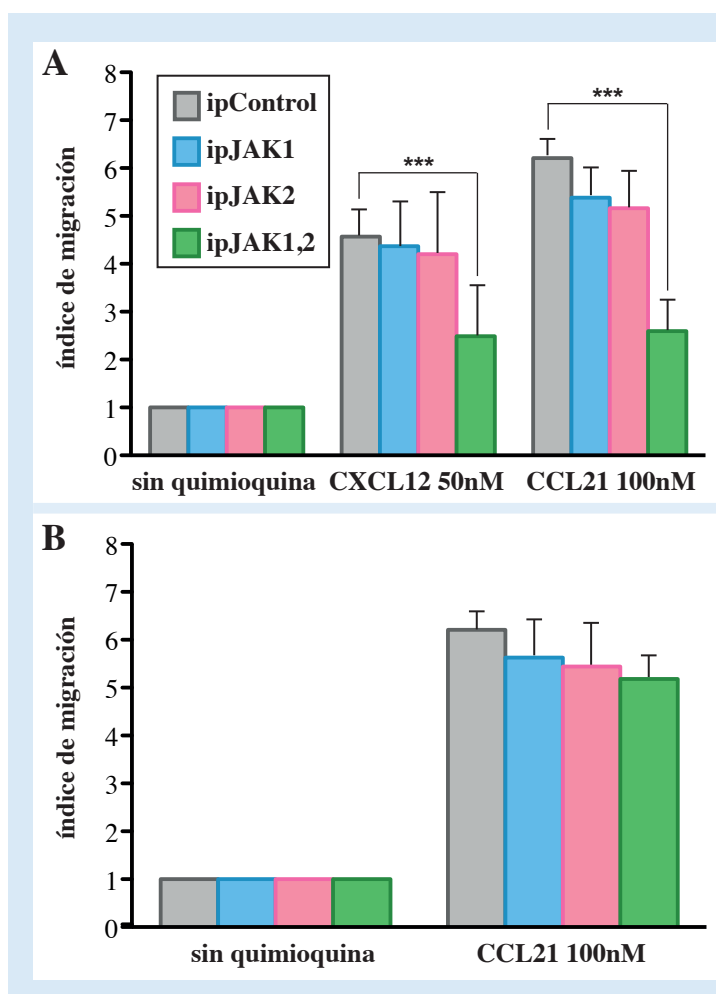


Figura 15. Migración de linfocitos T nucleofectados en respuesta a CXCL12 y CCL21 en cámaras de Boyden. Las gráficas representan el número de veces de más que han migrado los linfocitos T nucleofectados con el ARNip control (gris), los linfocitos T nucleofectados con el ARNip de JAK1 (azul), los linfocitos T nucleofectados con el ARNip de JAK2 (rosa) y los linfocitos T nucleofectados con el ARNip de JAK1 y JAK2 (verde) en presencia de quimioquina respecto al basal (los linfocitos T que han migrado en ausencia de quimioquina). En la figura (A) los *transwell* se encuentran tapizados con ICAM-1, mientras que en la figura (B) no. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (***) $p < 0,001$.

1.3.2. Estudio in vivo

Para estudiar la relevancia de este efecto “in vivo” los linfocitos T purificados fueron nucleofectados con las mezclas de ARNip para JAK1, JAK2, o JAK1 y JAK2 simultáneamente y fueron marcados con un colorante vital rojo, CMTMR. Se realizaron mezclas de cada tipo celular por separado con los linfocitos nucleofectados con los ARNip control marcados con el colorante vital verde CMFDA, en una relación 1:1. Las distintas mezclas de linfocitos rojos y verdes se inyectaron en ratones C57Bl/6, por vía intravenosa y pasadas 6 horas los animales fueron sacrificados y el bazo y los ganglios periféricos (axilares, inguinales y mesentéricos), fueron procesados para poder estudiar la relación de linfocitos rojos/verdes que habían llegado al interior de los ganglios linfáticos por citometría de flujo. El resultado de este experimento mostró que había una pequeña reducción en el número de linfocitos T que llegaban a los ganglios con la expresión de JAK1 o de JAK2 reducida, pero que esa diferencia no fue significativa respecto a los linfocitos T control (**Fig. 16 A**).

Sin embargo, cuando se evaluaron los linfocitos T en los que se había reducido de forma simultánea la expresión de las dos quinasas, observamos que un $66.46 \pm 0.2\%$ eran linfocitos nucleofectados con el ARNip control, mientras que sólo el $33.53 \pm 0.2\%$ eran linfocitos deficientes en JAK1 y JAK2 (**Fig. 16 B**), es decir, llegaban el doble de linfocitos control que de linfocitos con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida. Como control se evaluó la relación de linfocitos verdes y rojos que llegaban al bazo, ya que la migración a este órgano no es un proceso mediado por quimioquinas (Scimone et al. 2004). Pudimos observar que en este caso el ratio 1:1 inyectado no sufría variaciones, ambos tipos celulares llegaban de igual modo.

Como control adicional repetimos el experimento sacrificando al ratón a las 3 horas después de la inyección con las mezclas de los linfocitos verdes y rojos. Queríamos así descartar alteraciones en los resultados debido a una posible proliferación de los linfocitos en el ganglio, a un proceso de muerte inducida, o a que ya hubieran empezado a abandonar el ganglio (Cyster et al. 2012). En este caso el $69.87 \pm 0.2\%$ de los linfocitos que migran a los ganglios eran linfocitos control, frente al $30.12 \pm 0.1\%$ que eran linfocitos nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 de manera simultánea (**Fig. 16 B**).

Los resultados fueron muy similares marcando los linfocitos control con la sonda CMTMR y los nucleofectados con los ARNip para JAK1 y JAK2 con la sonda CMFDA, descartando un efecto inespecífico del colorante vital empleado.

Estos experimentos confirman el resultado del experimento in vitro y demuestran que la presencia de JAK1 y JAK2 es necesaria para la migración de los linfocitos T vírgenes a los ganglios in vivo y que además existe redundancia en la función de ambas quinasas.

Para asegurarnos de que la expresión de JAK1 y JAK2 se mantuvo reducida durante las horas que duró el experimento más largo (6 horas), realizamos el mismo ensayo de reconstitución, pero analizamos por PCR cuantitativa (Q-PCR) los niveles de JAK1, JAK2, JAK3 y CXCR4 en los linfocitos que habían llegado. Para ello, y mediante *sorting* celular, separamos los dos tipos de linfocitos aprovechando su marcaje diferente con el colorante vital. Los niveles de ARN mensajero (ARNm) en los linfocitos recuperados indicaron que la expresión de JAK1 y JAK2 se mantuvo reducida, y con niveles muy similares, a los que presentaban los linfocitos antes de ser inyectados. Como control medimos la expresión de

JAK3 y CXCR4, y los datos indicaron que tampoco sus niveles de ARNm variaron durante el experimento (**Fig. 16 C**).

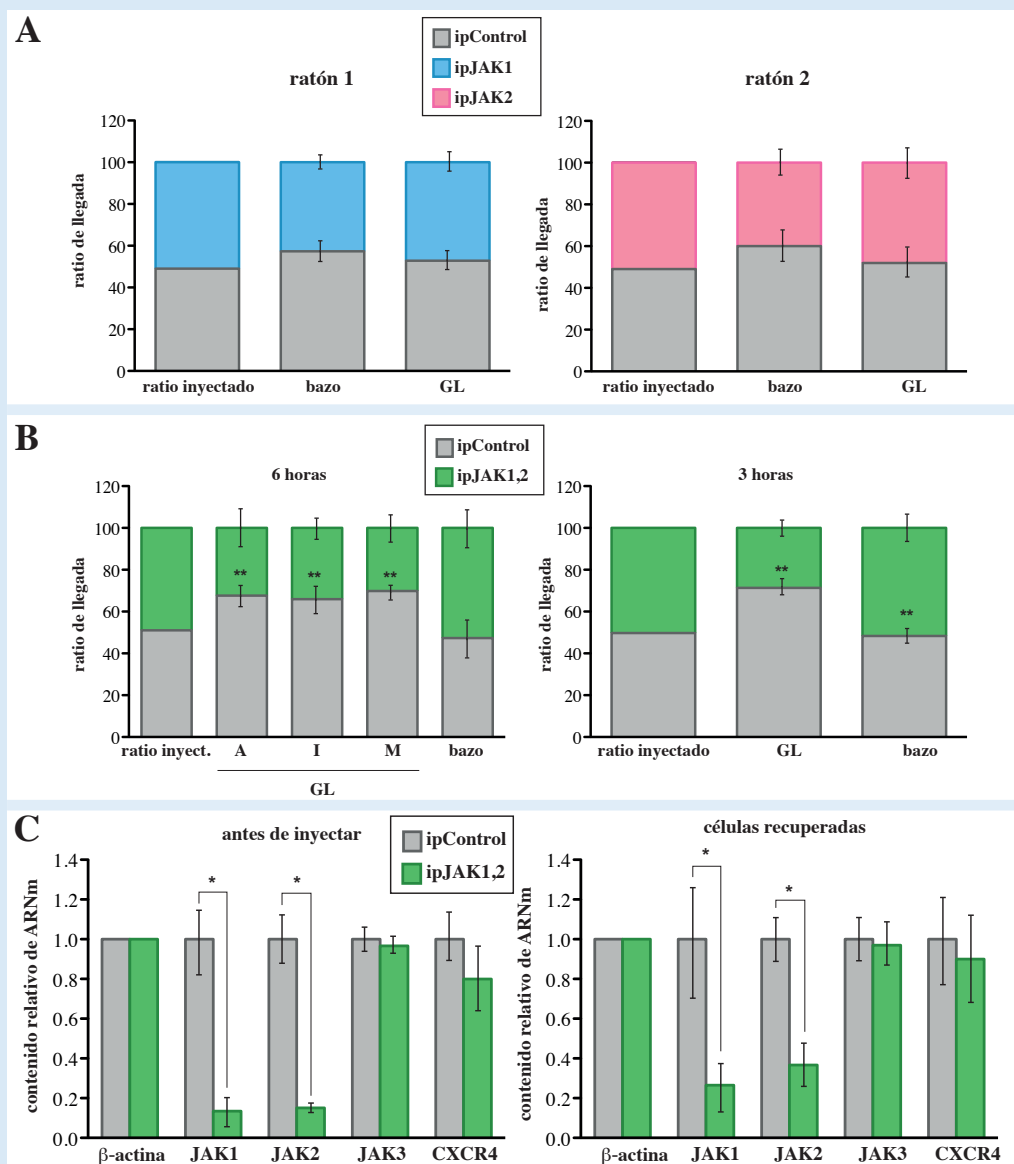


Figura 16. Migración de linfocitos T nucleofectados “in vivo”. (A) Las gráficas representan la relación de linfocitos T nucleofectados con el ARNip de JAK1 (azul) o con el ARNip de JAK2 (rosa) respecto al de linfocitos T nucleofectados con el ARNip control (gris) que llegaron al bazo y a los ganglios linfáticos de ratones a los que se les han pinchado una mezcla con el 50% de linfocitos de cada tipo (ratio inyectado) de manera intravenosa. (B) Ambas gráficas representan la relación de linfocitos T nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (verde) respecto al de linfocitos T nucleofectados con el ARNip control (gris) que llegaron al bazo y a los ganglios de ratones a los que se les pincharon una mezcla con el 50% de linfocitos de cada tipo (ratio inyectado) de manera intravenosa sacrificado a las 6 horas o sacrificado a las 3 horas. A=ganglio linfático axilar, I= ganglio linfático inguinal y M= ganglios linfáticos mesentéricos. (C) Resultado de la Q-PCR, que representa el contenido relativo de ARN mensajero de JAK1, JAK2, JAK3 y CXCR4 de los linfocitos T nucleofectados con el ARNip control (gris) y de los linfocitos T nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (verde) antes y después de ser inyectados en los ratones. El contenido relativo de ARNm de β-actina se empleó como control. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (* p<0,05; ** p<0,01).

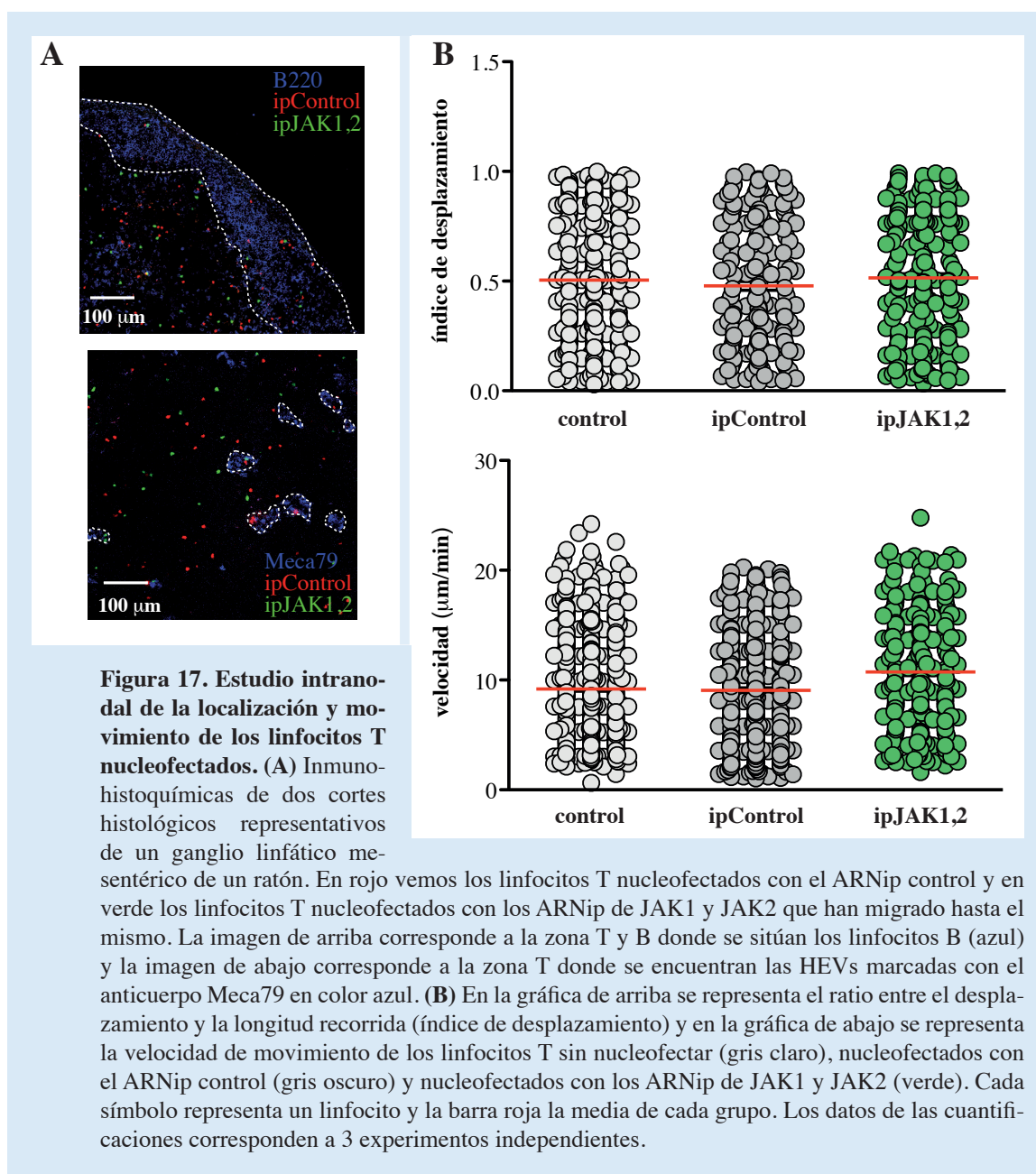
Estudio de la localización y comportamiento de los linfocitos inyectados dentro de los ganglios

Los experimentos anteriores permitieron demostrar que los linfocitos T con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida poseían menor capacidad para migrar a los ganglios linfáticos, pero sin embargo, alguno continuaba llegando. Nos preguntamos entonces, si aquellos que llegaban presentaban diferencias en su localización y movimiento dentro del ganglio.

De nuevo, se inyectaron por vía intravenosa en ratones C57Bl/6 una mezcla de linfocitos T nucleofectados con ARNip de JAK1 y JAK2, de manera simultánea, y marcados con la sonda CMTMR, y linfocitos T nucleofectados con el ARNip control marcados con la sonda CMFDA, en un ratio 1:1. A las 6 horas de la inyección los ratones se sacrificaron, y los ganglios linfáticos periféricos fueron extraídos y criopreservados. El análisis inmunohistoquímico de los cortes histológicos realizados, usando como referencia el marcaje de linfocitos B (anticuerpo anti-B220) y de HEVs (Meca79) demostró que los linfocitos rojos y verdes ocupaban localizaciones similares, pudiendo concluir que la migración dentro de los ganglios de los linfocitos T vírgenes es independiente de JAK1 y JAK2 (**Fig. 17 A y Vídeo 1**)

El estudio de la dinámica del movimiento de los linfocitos se llevó a cabo mediante microscopía intravital multifotón en colaboración con el Doctor J. V. Stein (Theodor Kocher Institut, Berna). Para ello se inyectó por vía intravenosa en ratones C57Bl/6 una mezcla 1:1:1 de linfocitos T vírgenes purificados sin nucleofectar, marcados con la sonda CMAC (color azul), junto a linfocitos T nucleofectados con el ARNip control, marcados con la sonda CMFDA (color verde), y linfocitos T nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 a la vez, marcados con la sonda CMTMR (color rojo). A las 6 horas de la inyección el animal fue anestesiado y se expusieron los ganglios poplíteos para ser evaluados con un microscopio multifotón (Olympus BX50WI). Para una correcta localización de los linfocitos, las HEVs fueron marcadas inyectando por vía intravenosa 20 minutos antes de empezar a grabar una solución con el anticuerpo Meca-79 marcada con el fluorocromo Alexa633. El movimiento de los linfocitos fue seguido a través del parénquima del ganglio durante períodos de 30 minutos y se analizaron dos parámetros, la velocidad de movimiento y la relación entre el desplazamiento y la longitud de la trayectoria, denominado índice de desplazamiento. La evaluación de ambos parámetros demostró que no había diferencias estadísticamente significativas en la dinámica de movimiento de ninguno de los tres tipos de linfocitos inyectados, ni en el índice de desplazamiento (0.46 ± 0.01 sin nucleofectar; 0.45 ± 0.01 ipControl; 0.50 ± 0.01 ipJAK1,2), ni en la velocidad con la que movían (9.19 ± 0.2 $\mu\text{m}/\text{min}$ sin nucleofectar; 9.07 ± 0.2 $\mu\text{m}/\text{min}$ ipControl; 9.71 ± 0.2 $\mu\text{m}/\text{min}$ ipJAK1,2) (**Fig. 17 B**).

Podemos entonces concluir que la reducción de la expresión de JAK1 y JAK2 en los linfocitos T vírgenes afecta a su capacidad de migración hacia los ganglios linfáticos y a su entrada en ellos, pero una vez en su interior, no influye ni en su localización dentro del ganglio, ni en sus parámetros dinámicos de velocidad o trayectoria.



1.4.Importancia de JAK1 y JAK2 en la capacidad de adhesión de los linfocitos

La activación de las integrinas mediada por las quimioquinas, es clave en los procesos de extravasación de los linfocitos T y dado que en nuestro modelo las quinasas JAK1 y JAK2 parecen ser claves para la llegada de los linfocitos a los ganglios, nos propusimos estudiar si las Janus quinasas también participaban en la adhesión mediada por integrinas.

1.4.1.Estudio de adhesión en condiciones de flujo

En primer lugar, ya que los linfocitos T circulan en el torrente sanguíneo, y por lo tanto tienen que vencer la resistencia del flujo sanguíneo para poder adherirse a las paredes endoteliales, evaluamos la implicación de las quinasas JAK1 y JAK2 en la adhesión de los linfocitos usando cámaras de migración con flujo. Estas cámaras nos permiten medir la capacidad de

las células para adherirse a un sustrato en presencia de flujo. Los linfocitos T vírgenes purificados se nucleofectaron con el ARNip control o con los ARNip para JAK1 y JAK2 y se introdujeron por separado en una cámara, previamente tapizada con CXCL12 (2 μ M) e ICAM-1-Fc (6 μ g/ml) o con CCL21 (2 μ M) e ICAM-1-Fc (6 μ g/ml). En general, siempre se observó que los linfocitos con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida tenían tendencia a soltarse y continuar circulando más que los linfocitos control, pero el porcentaje de células adheridas varió en función de la quimioquina empelada. Así, bajo un flujo de 0,5 dinas/cm², en el caso de la cámara tapizada con CXCL12, un ~60% de los linfocitos nucleofectados con el ARNip control permanecieron adheridos, frente a un ~25% de los nucleofectados con los ARNip de JAK1 más JAK2 (**Fig. 18, arriba**), mientras que en la cámara tapizada con CCL21 el porcentaje de linfocitos T adheridos fue mayor, tanto en el caso de los linfocitos nucleofectados con los ARNip control (~75%), como en los nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (~50%), siendo menor la diferencia entre ambas condiciones (**Fig. 18, abajo**). Este resultado sugiere que el efecto de JAK1 y JAK2 sobre la extravasación de los linfocitos T vírgenes podría explicarse por tener estos reducida su capacidad de adhesión al endotelio vascular.

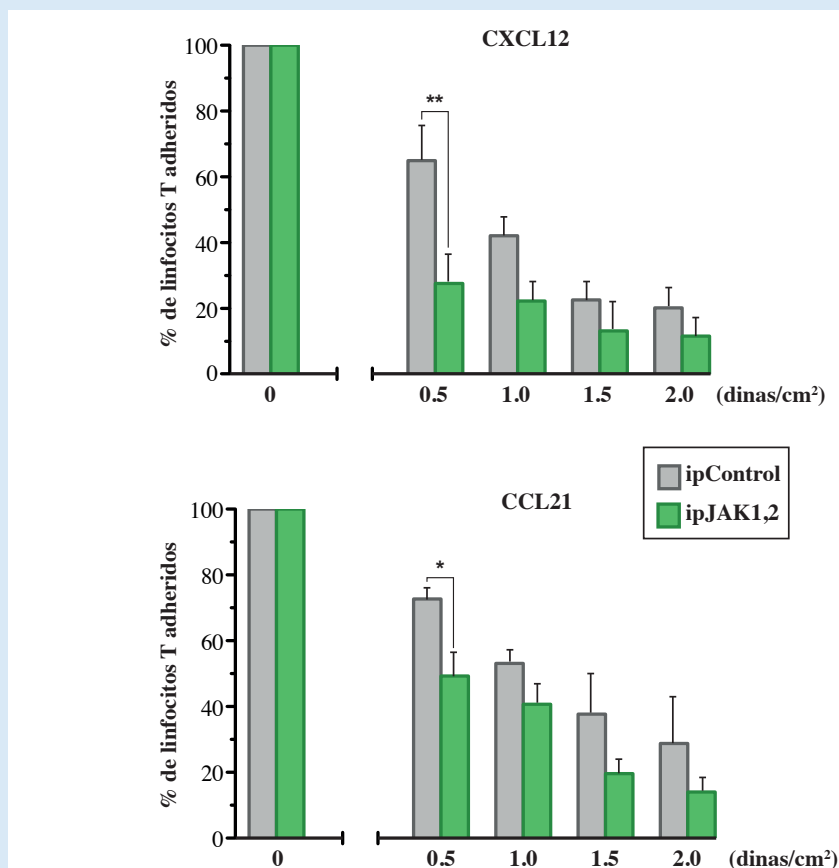


Figura 18. Capacidad de adhesión en flujo en respuesta a CXCL12 y CCL21 de los linfocitos T nucleofectados. Porcentaje de linfocitos T nucleofectados con el ARNip control (gris) y nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (verde) que permanecen adheridos en presencia de ICAM-1 y en repuesta a CXCL12 (gráfica de arriba) o a CCL21 (gráfica de abajo), al aplicar un flujo de diferentes intensidades, tomando como 100% los linfocitos T adheridos en ausencia de flujo. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (* p<0,05; ** p<0,01).

1.4.2. Adhesiones estáticas

Estudiamos entonces la adhesión en condiciones estáticas sin flujo, mediada por CXCL12 y CCL21 (Scimone et al. 2004).

Para ello se cuantificó el porcentaje de linfocitos nucleofectados con el ARNip control o con los ARNip de JAK1 más JAK2 que se adhirió a una superficie tapizada con el ligando de la integrina LFA-1, ICAM-1-Fc (1.75 µg/pocillo) y CXCL12 (10nM) o con ICAM-1-Fc (1.75 µg/pocillo) y CCL21 (20nM). La capacidad de adhesión de los linfocitos con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida fue menor que la capacidad de los linfocitos control (**Fig. 19 A**).

Como control se midió por citometría de flujo la expresión de la integrina LFA-1, comprobando que su expresión en los linfocitos nucleofectados con el ARNip control era muy similar a la que presentaban los linfocitos nucleofectados con los ARNip de JAK1 y de JAK2 (**Fig. 19 B**).

Para demostrar que la reducción en la adhesión era debida a la implicación de JAK1 y JAK2 en un mecanismo específico de activación desde el receptor de quimioquinas hasta la integrina, empleamos como estímulo el activador inespecífico de integrinas $MnCl_2$, observando que este caso la adhesión en los dos tipos de linfocitos T nucleofectados era muy parecida (**Fig. 19 A**). Estos resultados indican que JAK1 y JAK2 están implicados en la activación de las integrinas mediada por quimioquinas, y que sus niveles afectan a la adhesión celular.

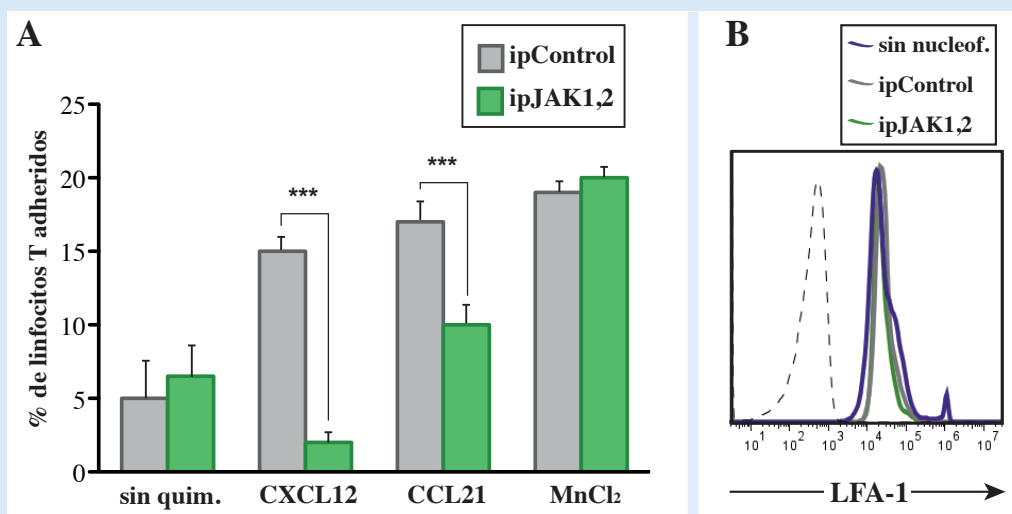
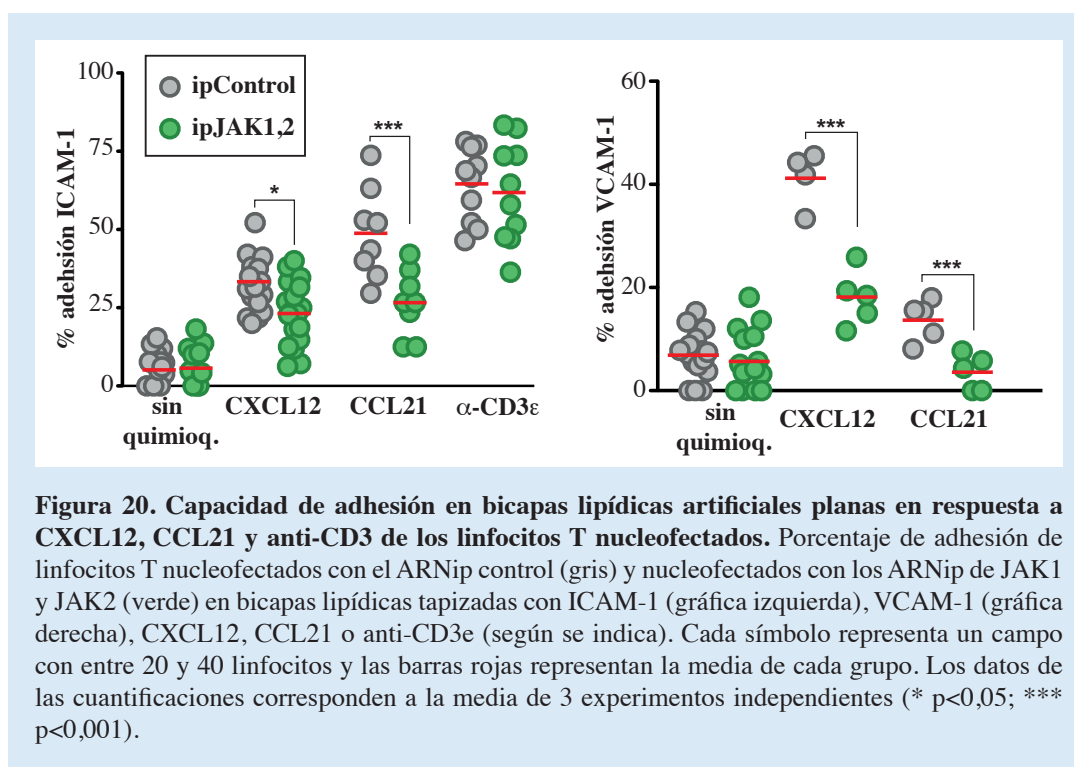


Figura 19. Capacidad de adhesión en estático en respuesta a CXCL12 y CCL21 de los linfocitos T nucleofectados. (A) Porcentaje de linfocitos T nucleofectados con el ARNip control (gris) o con los ARNip de JAK1 y JAK2 (verde) que se adhieren a ICAM-1 en repuesta a CXCL12 o a CCL21, calculado en función de una curva patrón realizada con un número conocido y creciente de linfocitos T. El $MnCl_2$ se empleó como control positivo de la activación de las integrinas. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (***) $p < 0,001$). (B) Perfil de expresión en membrana de LFA-1 representativo de los linfocitos T sin nucleofectar (morado), nucleofectados con los ARNip control (gris) y nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (verde).

1.4.3. Adhesiones sobre bicapas lipídicas

Para confirmar el resultado anterior en un modelo in vitro más parecido al fisiológico, empleamos la técnica de microscopía IRM (del inglés *Interference Reflection Microscopy*), usando un modelo basado en la preparación de bicapas lipídicas artificiales con ICAM-1 (150 molecules/ μm^2) tapizadas con CXCL12 (100nM) o CCL21 (100nM). Los linfocitos con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida mostraron una reducción significativa en su adhesión a ICAM-1 mediada por ambas quimioquinas, no existiendo diferencias en la adhesión basal (Fig. 20 izq.).

Para comprobar, sin embargo, si los efectos observados eran dependientes de la presencia de LFA-1, y teniendo en cuenta que las quimioquinas también son capaces de activar a VLA-4 (Ganghammer et al. 2015), estudiamos si JAK1 y JAK2 también estaban implicadas en la activación de esta otra integrina. Para ello repetimos el experimento anterior poniendo en la bicapa lipídica el ligando de VLA-4, VCAM-1 (150 molecules/ μm^2) más CXCL12 (100nM) o CCL21 (100nM) y comprobamos que también se producía una disminución en la adhesión de los linfocitos T con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida, sin existir diferencias en la capacidad de adhesión basal (Fig. 20 der.).



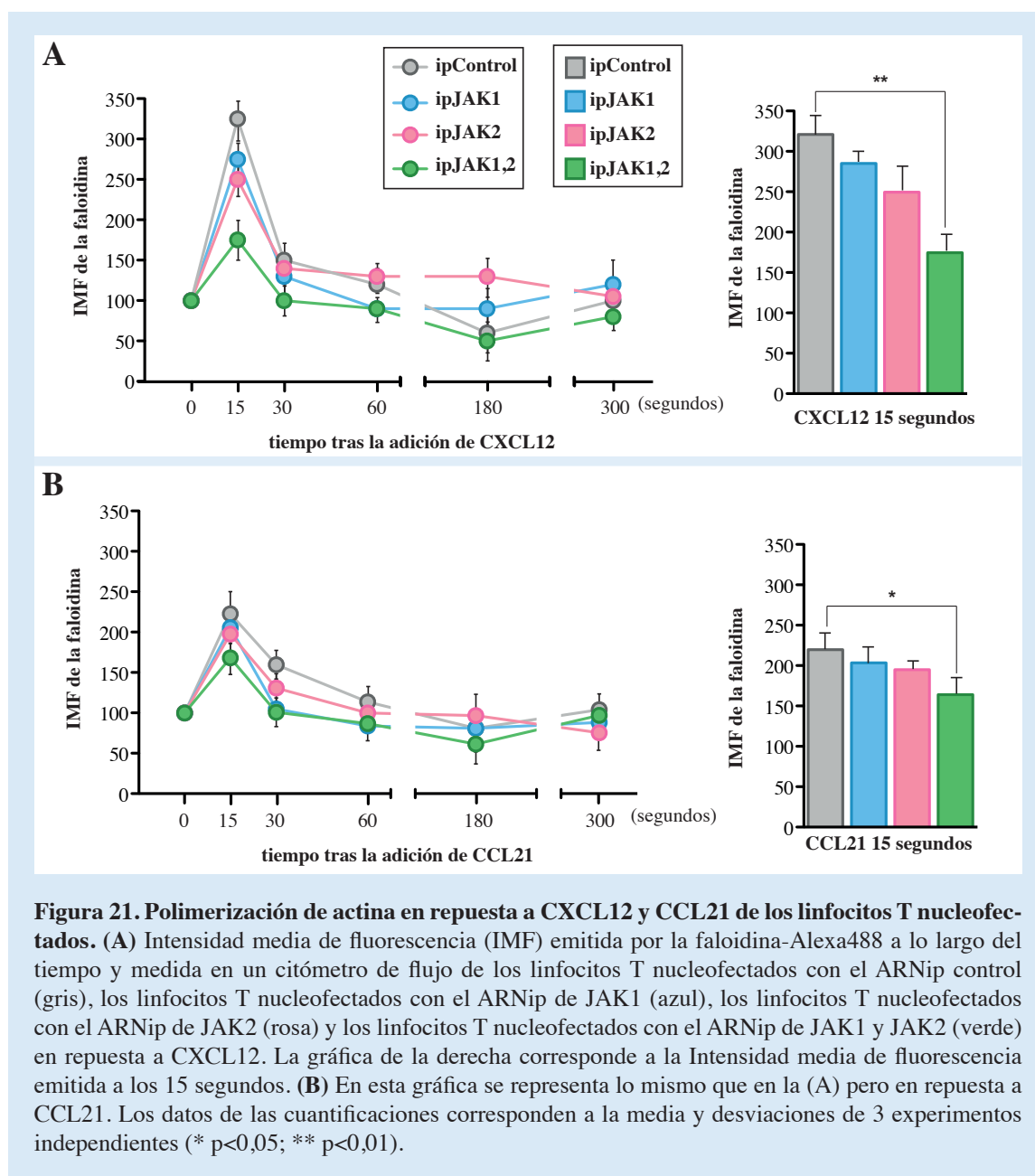
Estudiamos entonces si el efecto observado sobre la activación de las integrinas era específico de la ruta activada por las quimioquinas, estimulando el TCR, ya que éste también activa a las integrinas (Burbach et al. 2007). Empleando el mismo sistema experimental estudiamos si JAK1 y JAK2 afectaban a la activación de la integrina LFA-1 a través de la activación del TCR. Tapizamos entonces la bicapa lipídica con ICAM-1 (150 molecules/ μm^2) y con un anticuerpo anti-CD3ε (1 μM /ml), observando que no se producían diferencias significativas entre la capacidad de adhesión de los linfocitos nucleofectados con el ARNip

control y los nucleofectados con los ARNip de JAK1 más JAK2 (Fig. 20 izq.).

Con todos estos resultados podemos concluir que JAK1 y JAK2 están implicados en la adhesión de los linfocitos T vírgenes al endotelio vascular mediada por quimioquinas, y en consecuencia esto influye en su extravasación a los ganglios linfáticos. Además, JAK1 y JAK2 participan específicamente en la ruta de activación de las integrinas desde el receptor de quimioquinas.

1.5. Papel de JAK1 y JAK2 en la capacidad de polimerización de actina en los linfocitos T vírgenes

El citoesqueleto de actina es un elemento clave en la migración y adhesión de las células (Dupre et al. 2015). Se ha demostrado que CXCR4 y CCR7 a través de la unión a sus respectivos ligandos son capaces de desencadenar la polimerización de actina, proceso esencial para que la célula pueda migrar y adherirse (Burkhardt et al. 2008, Ambriz-Pena et al. 2014).



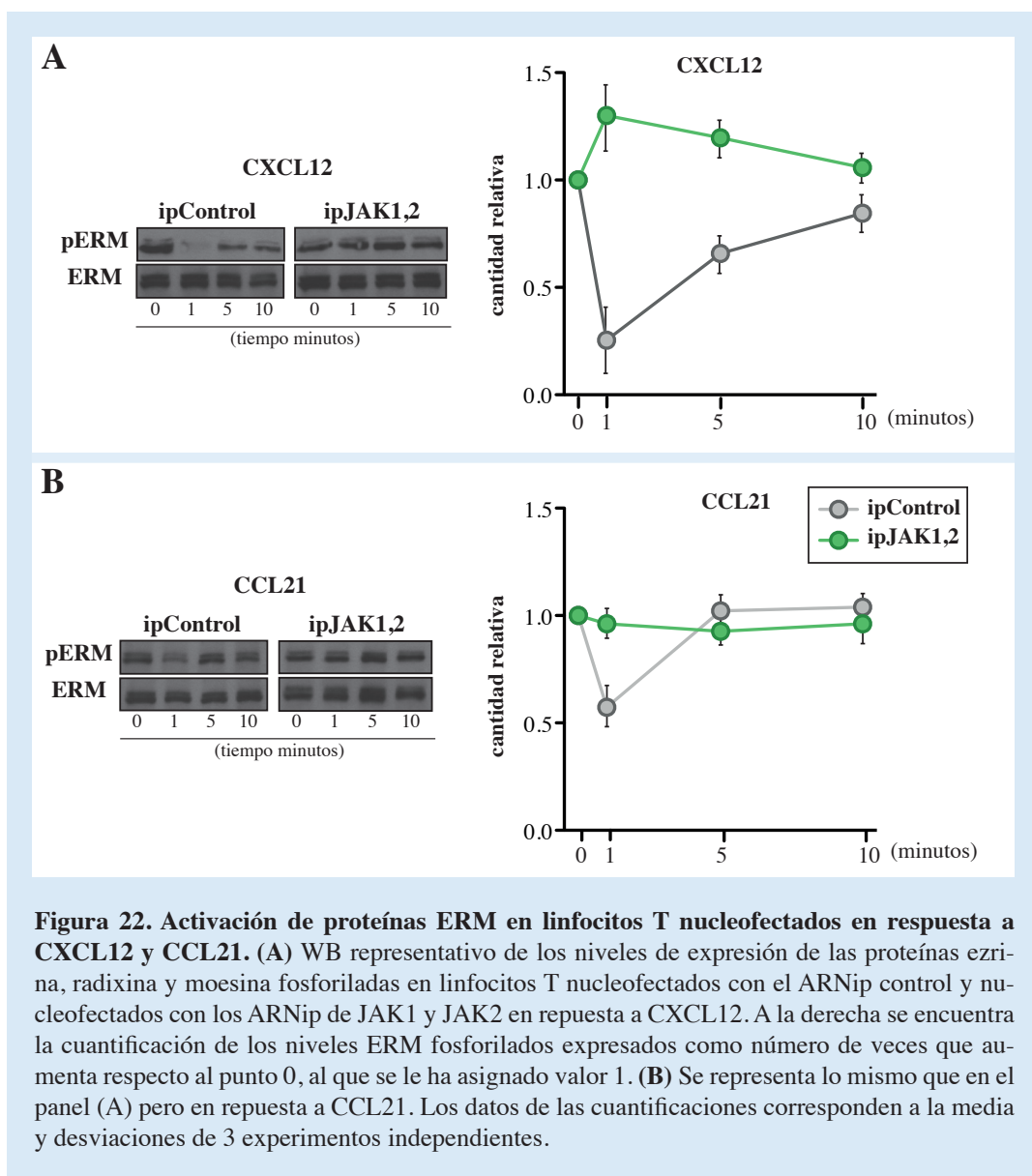
Teniendo en cuenta las observaciones anteriores, analizamos si la polimerización de actina mediada por quimioquinas se veía afectada por la reducción de JAK1 y JAK2 en los linfocitos T.

Los linfocitos T vírgenes purificados se nucleofectaron con ARNip control, con ARNip de JAK1, con ARNip de JAK2 o con los ARNip de JAK1 y JAK2 simultáneamente. Se evaluó la polimerización de actina tras la activación a diferentes tiempos con las quimioquinas CXCL12 (50nM) o CCL21 (100nM), mediante citometría de flujo tiñendo con faloidina marcada con el fluorocromo Alexa-488. CXCL12 y CCL21 provocaron una rápida y transitoria polimerización de la actina, siendo el pico máximo a los 15 segundos en los linfocitos nucleofectados con ARNip control, aunque el estímulo producido por CXCL12 provocó una tinción más intensa. En los linfocitos con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida ambas quimioquinas provocaron una menor polimerización de la actina. Este resultado indica que la activación de JAK1 y JAK2 por las quimioquinas influye directamente en la polimerización de la actina. En cuanto a los linfocitos en los que se había reducido la expresión únicamente de uno de los dos JAKs, no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los linfocitos control, confirmando de nuevo, que existe un efecto compensatorio entre la dos quinasas (**Fig. 21 A y B**).

1.5.1. Implicación de JAK1 y JAK2 en la activación de proteínas ERM

En la cascada de señalización que relaciona el receptor de quimioquinas con la polimerización de actina, se sitúa un grupo de proteínas que unen el citoesqueleto de actina con la membrana plasmática [Ezrina, Moesina y Radixina (ERM)]. Cuando éstas están fosforiladas se encuentran unidas al citoesqueleto y su defosforilación favorece el desanclaje y la consiguiente polarización celular (Bretscher et al. 2002). Además, se sabe que en linfocitos T humanos CXCL12 induce una rápida defosforilación de estas proteínas y la polarización de los linfocitos (Brown et al. 2003). Dado que las Janus quinasas tienen en su estructura un dominio de unión FERM (Babon et al. 2014) parece posible que pudieran unirse a ellas conectando así con el citoesqueleto de actina.

Estudiamos entonces si la reducción de la expresión de JAK1 y JAK2 en los linfocitos T vírgenes alteraba el ciclo de defosforilación-fosforilación de las proteínas ERM inducido por las quimioquinas CXCL12 y CCL21. Este estudio se llevó a cabo nucleofectando los linfocitos T vírgenes purificados con ARNip control o con ARNip de JAK1 más JAK2 y estimulando los linfocitos con CXCL12 (50nM) o con CCL21 (100nM) a distintos tiempos. Los linfocitos una vez estimulados fueron lisados y analizamos la capacidad de fosforilación de las proteínas ERM mediante la técnica de WB usando un anticuerpo anti-pERM. Los resultados mostraron que las quimioquinas CXCL12 y CCL21 provocan de manera transitoria la defosforilación de las proteínas ERM en los linfocitos T control, mientras que no lo hacen sobre los linfocitos T con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida (**Fig. 22 A y B**). Demostrando así, que además de en la ruta de activación de las integrinas desencadenada por la activación de los receptores de quimioquinas CXCR4 y CCR7, JAK1 y JAK2 también están implicados en la remodelación del citoesqueleto de actina.

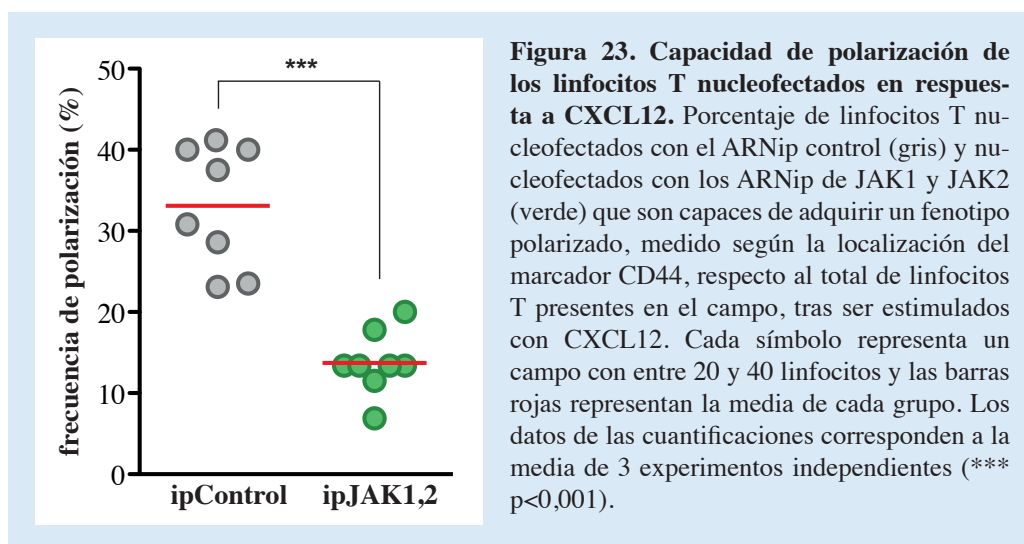


1.5.2. Implicación de JAK1 y JAK2 en la capacidad de polarización celular

Aunque la polarización de una célula es dependiente del tipo celular, está demostrado que el citoesqueleto de actina y las proteínas ERM participan activamente en el proceso (Gautreau et al. 2002). Debido a las alteraciones en la activación de las proteínas ERM en los linfocitos T deficientes en JAK1 y JAK2, estudiamos si la capacidad de polarización el linfocito también se veía alterada. Para ello los linfocitos T vírgenes purificados fueron nucleofectados con el ARNip control o con los ARNip de JAK1 y JAK2 y luego estimulados con CXCL12 a una concentración de 50nM durante 15 minutos. Pasado este tiempo se distribuyeron sobre cubres tapizados previamente con fibronectina y se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-CD44 biotinilado, ya que esta glicoproteína expresada en la superficie celular es un buen marcador del urópodo de la célula (Serrador et al. 1997, Lee et

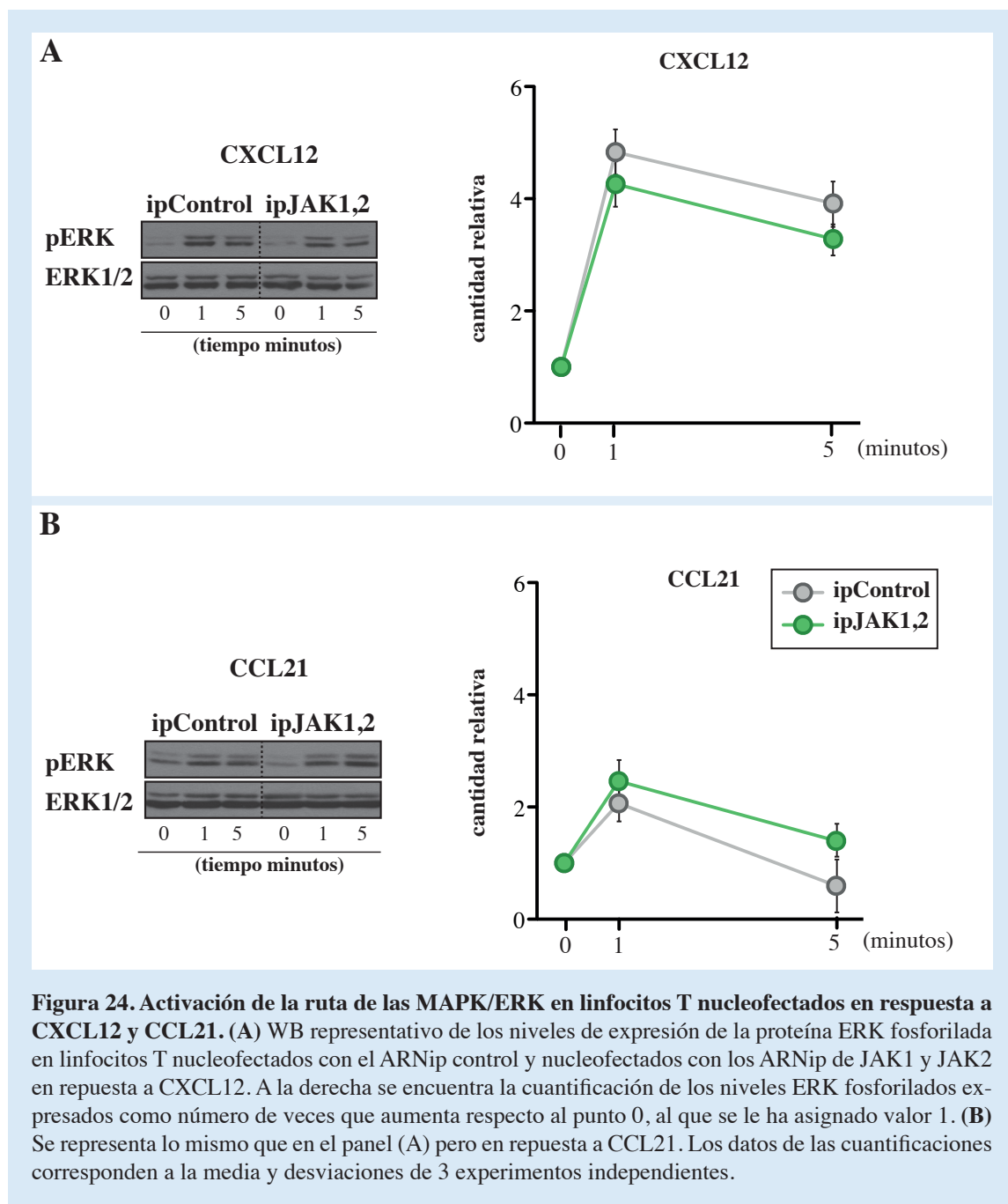
al. 2004). La cuantificación del número de células con expresión de CD44 acumulado en la zona del urópodo fue significativamente mayor en el caso de los linfocitos control estimulados con CXCL12, que en el de los linfocitos deficientes para JAK1 y JAK2 (**Fig. 23**).

Teniendo en cuenta este resultado, así como la reducción observada en la capacidad para polimerizar actina y para activar a las proteínas ERM, podemos concluir que las Janus quinasas JAK1 y JAK2 son importantes en la cascada desencadenada por la activación de CXCL12 y CCL21, y que afectando a la polimerización de actina también participa en la polarización del linfocito T.



1.6. Especificidad de JAK1 y JAK2 en la ruta de activación de las integrinas desde el receptor de quimioquinas

Para comprobar si como consecuencia de la reducción de JAK1 y JAK2 no se producía una reducción general de la señalización desencadenada por las quimioquinas, que explicase todos los efectos observados, nucleofectamos los linfocitos T vírgenes purificados con los ARNip control o ARNip de JAK1 y JAK2 y evaluamos la fosforilación de las proteínas ERK1 y ERK2 tras el estímulo con CXCL12 (50nM) o con CCL21 (100nM). El resultado demostró que la reducción de la expresión de JAK1 y JAK2 no afectaba a la activación de estas MAPK (**Fig. 24 A y B**) y que por lo tanto los efectos observados, al reducir las JAK, eran específicos de la ruta de señalización que conduce desde el receptor de quimioquinas al citoesqueleto de actina y a la activación de las integrinas.



La implicación de las Janus quinasas en la activación de las integrinas por las quimioquinas, nos llevó a analizar el efecto de reducir la expresión de estas quinasas en otro proceso donde quimioquinas e integrinas pueden tener un papel muy relevante, la formación de la sinapsis inmunológica y la consecuente activación del linfocito T.

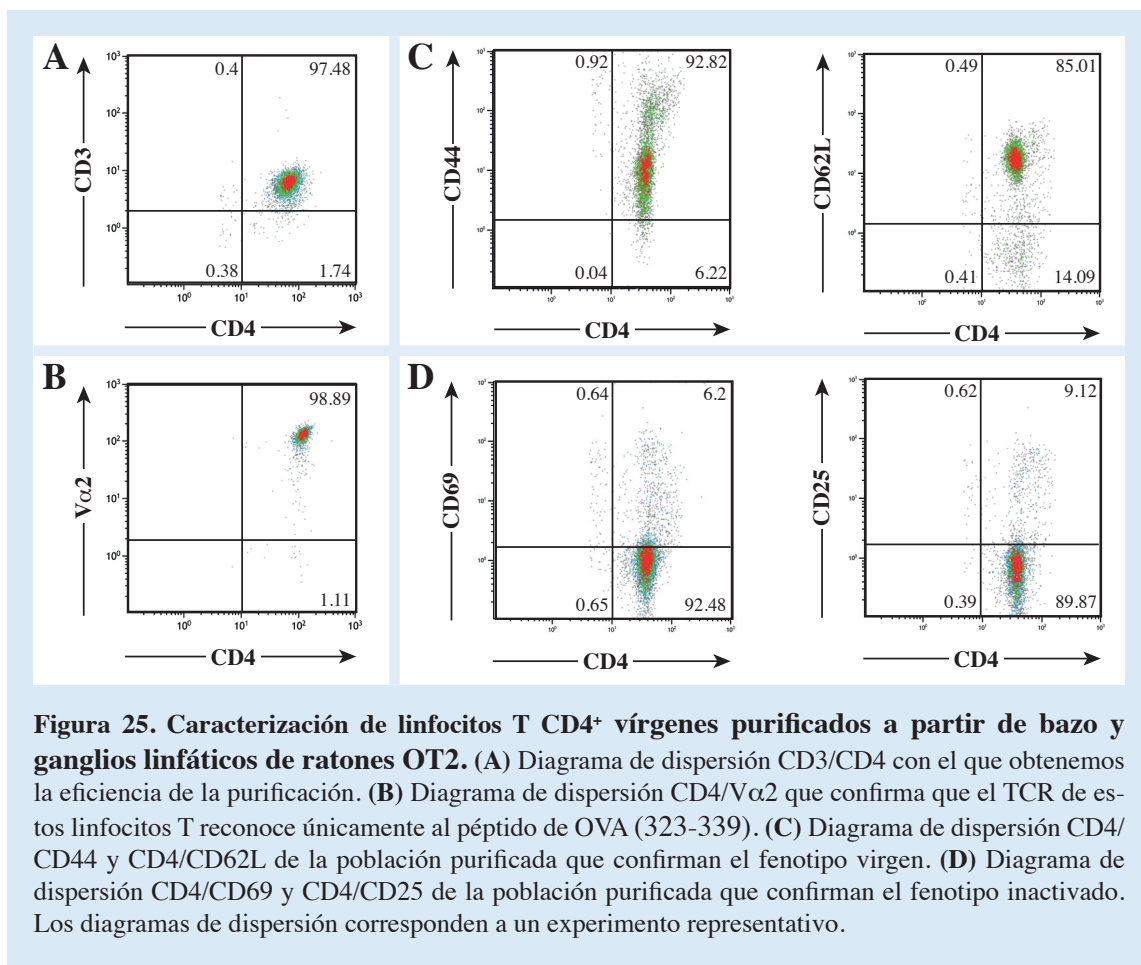
Las sinapsis inmunológicas que hemos estudiado en este objetivo del proyecto, han estado siempre formadas por linfocitos T CD4⁺ vírgenes, purificados a partir del bazo y los ganglios linfáticos periféricos (axilares, inguinales, mesentéricos) de ratones OT2, y por células dendríticas derivadas “in vitro” de monocitos obtenidos de médula ósea de ratones C57Bl/6, que maduraron en presencia de lipopolisacárido (LPS). En el momento de realizar los experimentos, las células dendríticas se cargaron con el péptido de OVA (323-339), específico para los TCR de los linfocitos T CD4⁺ de los ratones OT2, para aumentar de ese modo el número de sinapsis formadas y facilitar así su estudio.

2.Importancia del eje CXCR4-CXCL12 en la formación de la sinapsis inmunológica

2.1. Purificación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes de ratones OT2 y comprobación de su fenotipo

La purificación de los linfocitos T CD4⁺ se realizó por selección negativa y se comprobó la eficiencia de la misma cuantificando mediante citometría de flujo la expresión de CD4 en las células purificadas. Sólo se usaron para los experimentos aquellas preparaciones que alcanzaron al menos un 95% de pureza (**Fig. 25 A**). También se analizó con el anticuerpo anti-V α 2, específico para el tipo de TCR que presentan los linfocitos T CD4⁺ de los ratones OT2, su expresión por citometría de flujo (**Fig. 25 B**).

Cuando se forma la sinapsis inmunológica el linfocito no ha tenido contacto previo con antígenos y por lo tanto está inactivo. Debido a esto, consideramos que la mejor manera de recrear una sinapsis inmunológica sería empleando linfocitos vírgenes, por lo que el sistema de purificación sería por selección negativa. También se comprobó mediante citometría de flujo, la expresión de las moléculas CD62L y CD44 características del fenotipo virgen, viendo que el 85% de los linfocitos eran CD62L positivos de alta intensidad, y el 92% eran CD44 positivos de baja intensidad (**Fig. 25 C**). La falta de expresión de CD69 y CD25 confirmó su estado inactivo (**Fig. 25 D**).



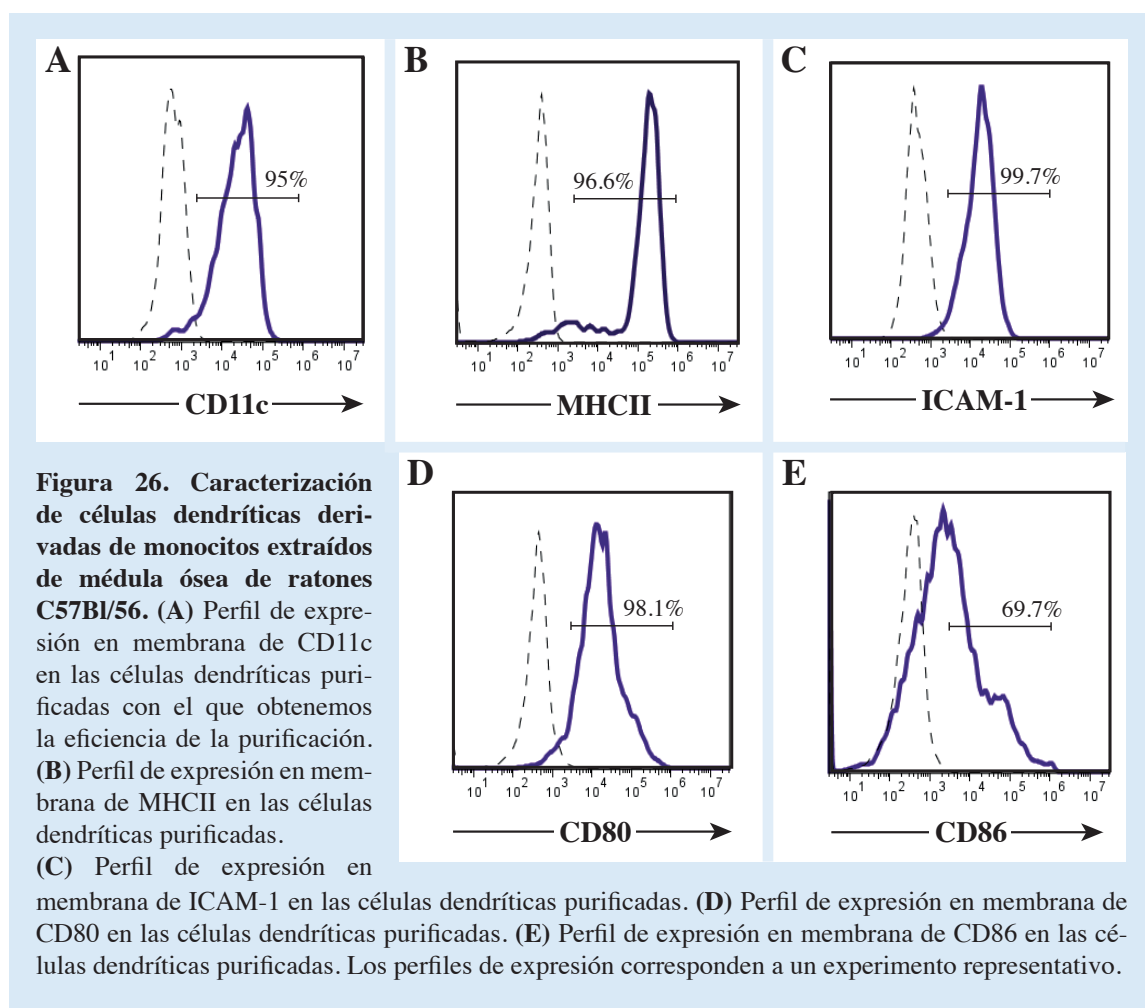
2.2. Caracterización de células dendríticas derivadas de monocitos extraídos de médula ósea

Del mismo modo que con los linfocitos T CD4⁺, también se comprobó la eficiencia de la purificación de las células dendríticas empleando un anticuerpo anti-CD11c, como marcador característico de este tipo celular (Poltorak et al. 2015) obteniendo una eficiencia mínima cercana al 95% (**Fig. 26 A**).

Además, tras la maduración de las células dendríticas con LPS, se caracterizó por citometría de flujo la expresión de moléculas presentes en la superficie que son necesarias para la formación de sinapsis inmunológicas. Empleamos anticuerpos específicos frente a:

- **MHCII**: necesario para que las células dendríticas presenten al péptido específico del TCR de los linfocitos CD4⁺ de los ratones OT2, el péptido de OVA 323-339.
- **CD54 o ICAM-1**: ligando de la integrina LFA-1 y por lo tanto elemento clave para nuestro estudio.
- **CD80 y CD86**: se unen a CD28, actuando como moléculas coestimuladoras.

La cuantificación de este experimento nos permitió comprobar que las células dendríticas derivadas de monocitos obtenidos a partir de médula ósea, y maduras con LPS, presentan en su superficie niveles altos de MHCII, 96%, (**Fig. 26 B**), ICAM-1, 99%, (**Fig. 26 C**), CD80, 98%, (**Fig. 26 D**) y CD86, 70%, (**Fig. 26 E**).



2.3. La inhibición de la señalización desencadenada por la unión de CXCL12 a su receptor CXCR4 impide la formación de la sinapsis inmunológica

Durante la formación de la sinapsis inmunológica, se ha descrito que el receptor de quimioquinas CXCR4 es reclutado a la zona de contacto entre las dos células, situándose en el pSMAC (Perez-Martinez et al. 2010). Su ligando, CXCL12, es secretado por las células estromales de la médula ósea y células endoteliales (Nagasawa et al. 1996), y por otros tipos celulares (Ponomaryov et al. 2000, Kollet et al. 2003). Concretamente, en la zona del ganglio donde los linfocitos T vírgenes escanean a las células dendríticas en busca de su antígeno específico, las células fibroblásticas reticulares son las encargadas de la secreción de esta quimioquina (Bajenoff et al. 2006, Link et al. 2007). Aunque algunos trabajos sostienen que las células dendríticas también son productoras de CXCL12 (Gonzalez et al. 2010) no creemos que sea así en nuestro caso. Datos de Q-PCR utilizando sondas específicas de CXCL12, demostraron que probablemente las responsables de su presencia en nuestra preparación de células dendríticas fuesen células estromales contaminantes de la médula ósea, y que las células dendríticas, si expresan algo, lo hacen de forma residual (**Fig. 27 A**). Sin embargo, si se observó CXCL12 en la superficie de las células dendríticas empleadas, como demostraron los experimentos de citometría de flujo empleando un anticuerpo específico anti-CXCL12, mientras que los linfocitos T CD4⁺ fueron negativos en este estudio (**Fig. 27 B**).

Para llevar a cabo el estudio el efecto del bloqueo del eje CXCL12/CXCR4 en la formación de la sinapsis inmunológica, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes tras ser purificados fueron pre-tratados con los inhibidores de esta ruta, AMD3100, que bloquea la unión de CXCL12 a CXCR4 y PTx que inhibe la activación de la proteína Gi. Como control de especificidad empleamos linfocitos pre-tratados en las mismas condiciones con el vehículo en el que va resuspendido la PTx, dimetil-sulfóxido (DMSO).

Las células dendríticas maduras y cargadas con el péptido de OVA 323-339 fueron empleadas para formar conjugados con los linfocitos pre-tratados, en un ratio de 1 célula dendrítica por cada 5 linfocitos (1:5).

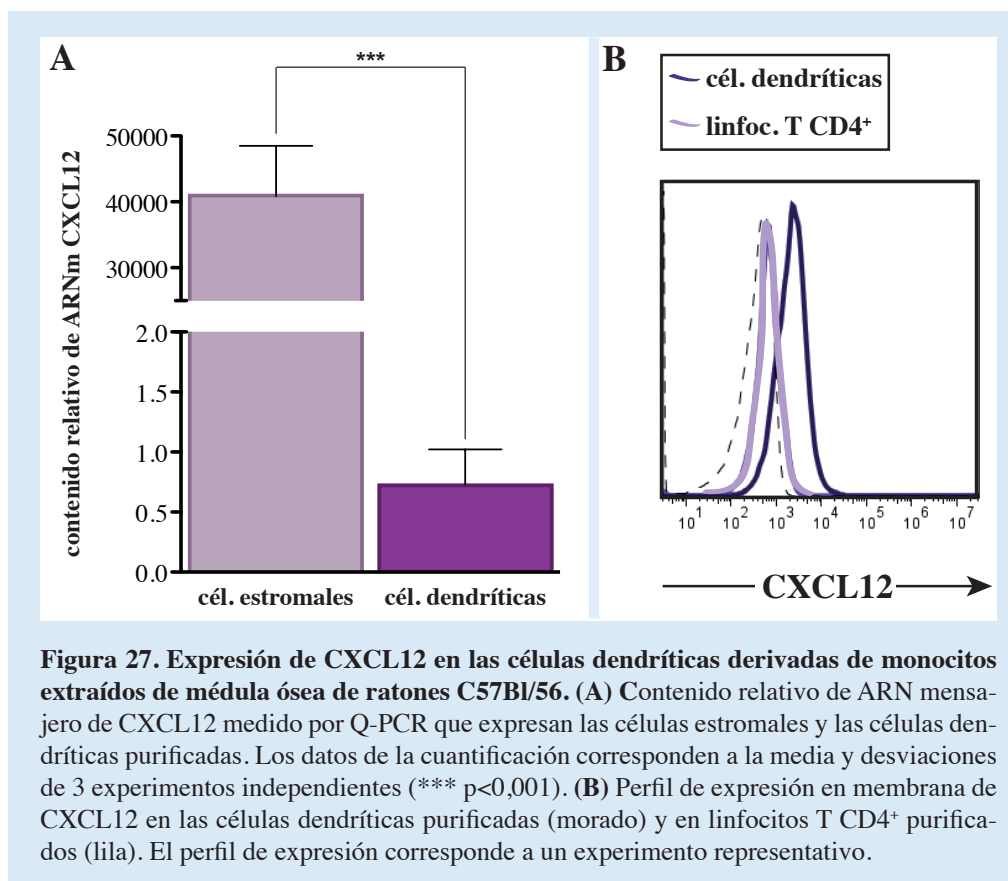


Figura 27. Expresión de CXCL12 en las células dendríticas derivadas de monocitos extraídos de médula ósea de ratones C57Bl/56. (A) Contenido relativo de ARN mensajero de CXCL12 medido por Q-PCR que expresan las células estromales y las células dendríticas purificadas. Los datos de la cuantificación corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (*** p<0,001). (B) Perfil de expresión en membrana de CXCL12 en las células dendríticas purificadas (morado) y en linfocitos T CD4⁺ purificados (lila). El perfil de expresión corresponde a un experimento representativo.

2.3.1. Evaluación del número de sinapsis

El citoesqueleto de actina es muy importante en la formación de sinapsis inmunológicas, y se concentra en la zona de contacto entre ambas células (Burkhardt et al. 2008), por lo que estudiamos si bloquear el eje CXCR4/CXCL12 afectaba a la acumulación de actina polimerizada en la zona de contacto.

Los conjugados formados fueron depositados, fijados y permeabilizados, en cubres de cristal previamente tapizados con poli-L-lisina, y luego marcados con faloidina-Alexa488, para detectar la actina polimerizada.

Tras la captura de imágenes de las inmunofluorescencias con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 meta, se cuantificó el número de sinapsis formadas en cada condición. Esta cuantificación se realizó contando como sinapsis aquellas en las que el linfocito T presentara la actina polimerizada acumulada en la zona de contacto entre él y la célula dendrítica, y se

estableció un porcentaje entre el número de sinapsis formadas y el número de células dendríticas presentes en cada campo. Así pudimos ver que el $87.5 \pm 3.5\%$ de los linfocitos empleados como control, o sin tratamiento, presentaban acúmulo de actina polimerizada en la zona de contacto entre ambas células. Pero este porcentaje se reducía significativamente en el caso de los linfocitos pre-tratados con AMD3100 ($39.7 \pm 2.5\%$) o con PTx ($20.3 \pm 1.5\%$) (**Fig. 28 A**).

En la sinapsis inmunológica, el centro organizador de microtúbulos (MTOC) se polariza hacia la zona de contacto entre ambas células (Martin-Cofreces et al. 2008). Para cuantificar esta polarización, formamos de nuevo conjugados entre células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ pre-tratados o sin tratar, siguiendo un ratio 1:5, y se depositaron sobre cristales tapizados con poli-L-lisina. Se fijaron y permeabilizaron, para posteriormente ser marcados con un anticuerpo anti- γ -tubulina, que permite estudiar la localización del MTOC. Las imágenes tomadas con el microscopio con focal Zeiss LSM 510 meta fueron analizadas y cuantificadas, mostrando que también existía un defecto en la translocación del MTOC hacia la zona de contacto entre las dos células en los linfocitos pre-tratados con AMD3100 o con PTx (**Fig. 28 B**).

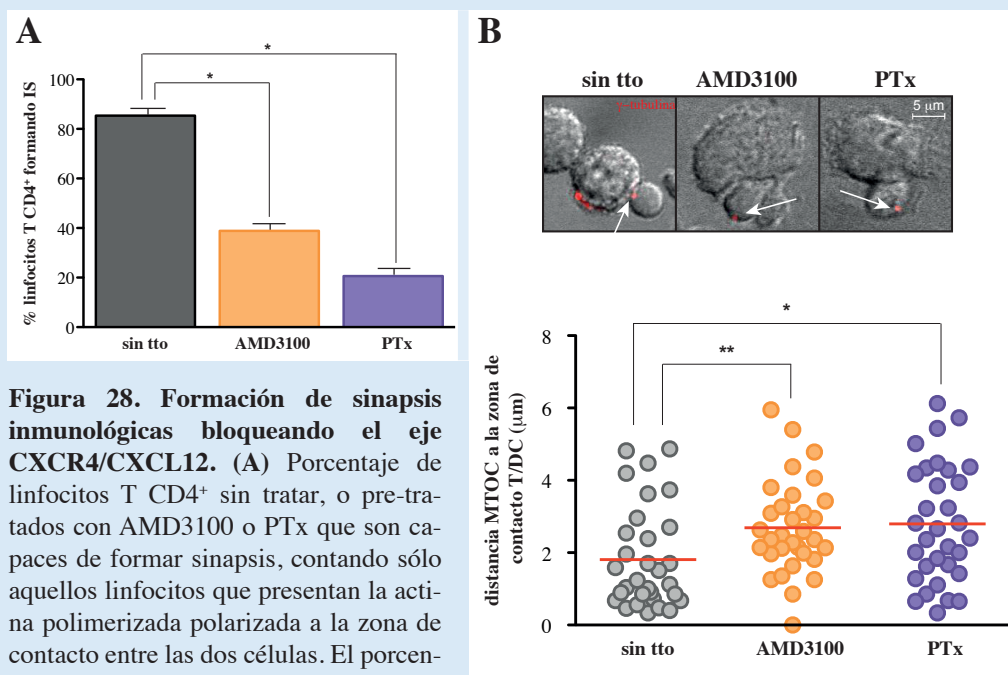
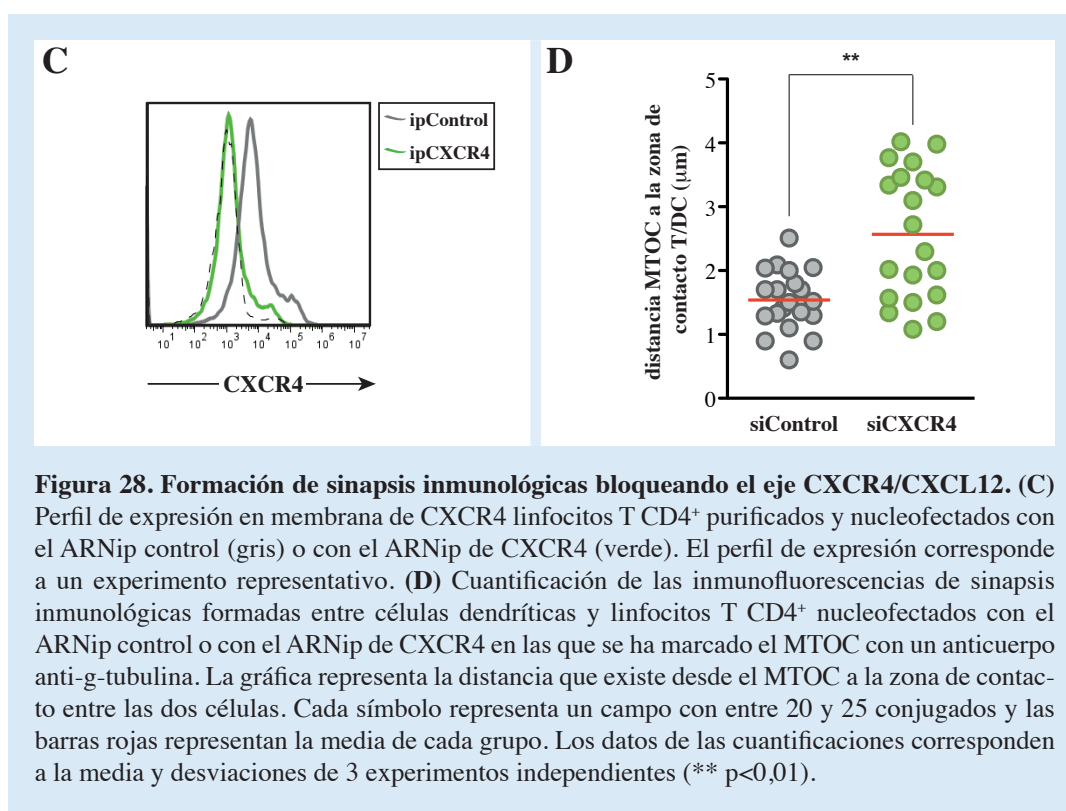


Figura 28. Formación de sinapsis inmunológicas bloqueando el eje CXCR4/CXCL12. (A) Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ sin tratar, o pre-tratados con AMD3100 o PTx que son capaces de formar sinapsis, contando sólo aquellos linfocitos que presentan la actina polimerizada polarizada a la zona de contacto entre las dos células. El porcentaje es el ratio entre el número de linfocitos que forman sinapsis y el número de dendríticas que hay por campo. (B) Imágenes representativas de inmunofluorescencias de sinapsis inmunológicas formadas entre células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ sin tratar, o pre-tratados con AMD3100 o PTx marcadas con un anticuerpo anti- γ -tubulina (rojo) que sitúa al centro organizador de microtúbulos (MTOC) y la correspondiente cuantificación en la que se representa la distancia que existe desde el MTOC a la zona de contacto entre las dos células. Cada símbolo representa un campo con entre 20 y 25 conjugados y las barras rojas representan la media de cada grupo. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (* p<0,05; *** p<0,001).

Se eliminó entonces la expresión de CXCR4 en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes purificados, mediante su nucleofección con una mezcla de ARN de interferencia pequeño (ARNip) para CXCR4, o con una mezcla de ARNip no codificante, que emplearemos como control del experimento. Pasadas las 24 horas necesarias para la reducción de la expresión del receptor, se comprobó dicha reducción, empleando un anticuerpo anti-CXCR4 y citometría de flujo y observamos que obteníamos una reducción de la expresión de ~ 85% (**Fig. 28 C**). Así, se formaron conjugados, empleando estos linfocitos T CD4⁺ con la expresión de CXCR4 reducida y las células dendríticas maduras y cargadas con el péptido de OVA 323-339, siguiendo el mismo protocolo y ratio que en los casos anteriores, y realizamos una inmunofluorescencia para estudiar la localización del MTOC. La cuantificación de las imágenes confocales mostró que la reducción de CXCR4 coincidía con una reducción en la translocación del MTOC a la zona de contacto entre el linfocito T y la célula dendrítica (**Fig. 28 D**). Estos resultados confirmaron la necesidad del eje CXCR4/CXCL12 para la formación de una sinapsis inmunológica correcta.

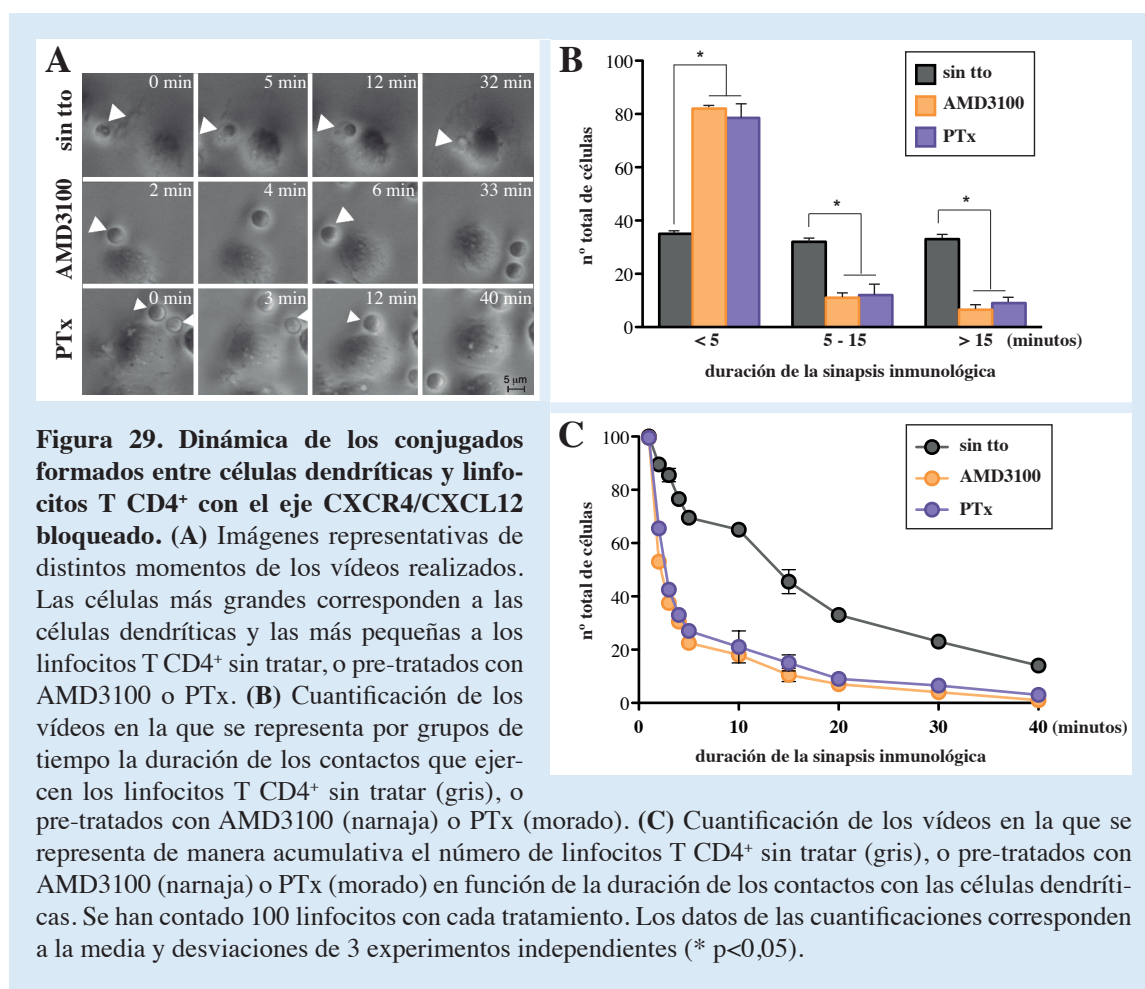


2.3.2. Estudio de la duración de los contactos entre el linfocito T CD4⁺ y la célula dendrítica

Hasta este momento habíamos analizado las sinapsis formadas a un tiempo fijo, por lo que, decidimos emplear videomicroscopía para estudiar la importancia de la señalización a través de CXCR4 en la dinámica de los conjugados desde el momento en que se ponen en contacto los dos tipos celulares. Para ello, las células dendríticas maduras y cargadas con el péptido de OVA 323-339 se depositaron en un pocillo previamente tapizado con fibronectina, y sobre ellas se distribuyeron los linfocitos T CD4⁺ vírgenes purificados sin tratar o pre-

tratados con los inhibidores AMD3100 o PTx. Las células fueron grabadas en un microscopio de fluorescencia MicroFluor desde el momento en el que se distribuyeron los linfocitos, tomando imágenes cada 30 segundos durante 90 minutos aproximadamente. El análisis de los vídeos mostró que la mayoría de los linfocitos sin tratar forman contactos de larga (> 15 minutos) o media duración (5-15 minutos) con las células dendríticas, mientras que en el caso de los linfocitos tratados con AMD3100 o con PTx la mayoría formó contactos de corta duración (< 5 minutos) (**Fig. 29 A, B y Vídeos 2, 3 y 4**). Una cuantificación en detalle de estos datos indicó que la media de la duración de los contactos de los linfocitos sin tratar es de 14 ± 1 minutos, mientras que los linfocitos tratados con AMD3100 hicieron contactos durante una media de 4 ± 0.3 minutos y los tratados con PTx durante 4.5 ± 0.2 minutos, es decir, ambos tratamientos redujeron significativamente la duración de los contactos (**Fig. 29 C**).

La señalización a través del eje CXCR4/CXCL12 está implicada en la polarización de la actina polimerizada y en la translocación del MTOC a la zona de contacto entre el linfocito T y la célula dendrítica, y por lo tanto en la formación de sinapsis inmunológicas. Además, este eje también está implicado en la duración de los contactos que se establecen entre las dos células.



2.4. Importancia de los glicosaminoglicanos en la formación de sinapsis inmunológicas “in vitro”

Los GAG son elementos esenciales en la fisiología de las quimioquinas “in vivo”. Para determinar si el papel de CXCL12 en la sinapsis inmunológica depende de su presentación al receptor presente en los linfocitos T, o por el contrario el ligando soluble tiene la misma función, se purificaron células dendríticas derivadas de monocitos obtenidos de médula ósea de ratones $\text{cxcl12}^{\text{Gagtm/Gagtm}}$ (Fig. 30 A). Esta mutación se traduce en que su CXCL12 no puede unirse al GAG heparán sulfato, pero su unión a CXCR4 no se ve afectada (Rueda et al. 2012). También se purificaron células dendríticas de ratones heterocigotos ($\text{cxcl12}^{\text{Gagtm/wt}}$) para esta mutación, y de ratones sin modificar genéticamente, que empleamos como controles. En primer lugar, se estudió la capacidad de formar sinapsis de linfocitos T CD4^+ con células dendríticas de estos ratones, empleando como indicador de la formación de la sinapsis la translocación del MTOC a la zona de contacto. Así, se formaron conjugados con los linfocitos T CD4^+ vírgenes purificados a partir del bazo y los ganglios periféricos (ALN, ILN, MLN) de ratones OT2, con las células dendríticas purificadas de ratones homocigotos ($\text{cxcl12}^{\text{Gagtm/Gagtm}}$), heterocigotos ($\text{cxcl12}^{\text{Gagtm/wt}}$) o sin modificar, maduras y cargadas con el péptido de OVA 323-339, en un ratio 5:1, y se realizó una inmunofluorescencia empleando un anticuerpo anti- γ -tubulina, para localizar el MTOC.

El análisis de las imágenes tomadas con el microscopio confocal mostró una deficiencia en la capacidad de translocación del MTOC en los conjugados formados con las células dendríticas de los ratones homocigotos (Fig. 30 B), sugiriendo que para la formación de la sinapsis es necesaria la retención de CXCL12 por parte de los GAG en la superficie de la célula dendrítica, para desde ahí ser presentado a CXCR4 en la superficie del linfocito T.

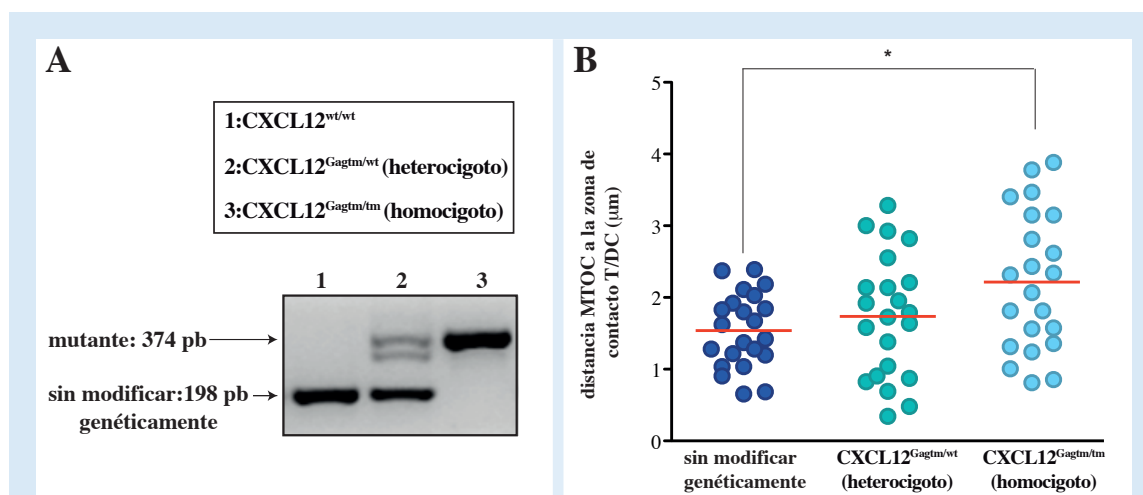
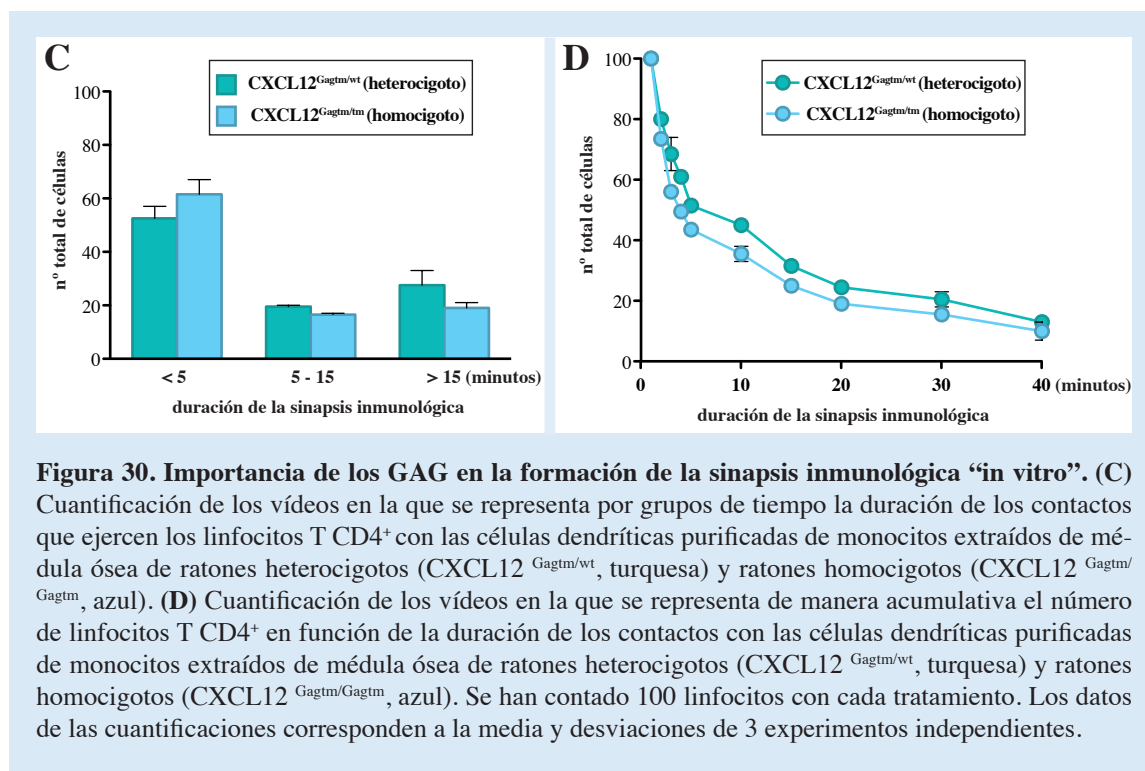


Figura 30. Importancia de los GAG en la formación de la sinapsis inmunológica “in vitro”. (A) Caracterización de los ratones CXCL12^{Gagtm/Gagtm} mediante PCR, a partir de ADN de ratones C57Bl/6, ratones CXCL12 heterocigotos (CXCL12^{Gagtm/wt}) y ratones CXCL12 homocigotos (CXCL12^{Gagtm/Gagtm}). (B) Cuantificación de las inmunofluorescencias de sinapsis inmunológicas formadas entre células dendríticas purificadas de monocitos extraídos de médula ósea de ratones C57Bl/6, ratones heterocigotos (CXCL12^{Gagtm/wt}) y ratones homocigotos (CXCL12^{Gagtm/Gagtm}) y linfocitos T CD4^+ en las que se ha marcado el MTOC con un anticuerpo anti- γ -tubulina. La gráfica representa la distancia que existe desde el MTOC a la zona de contacto entre las dos células. Cada símbolo representa un campo con entre 20 y 25 conjugados y las barras rojas representan la media de cada grupo. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$).

También estudiamos la dinámica de los conjugados mediante videomicroscopía, depositando las células dendríticas descritas en el experimento anterior y grabando su interacción con los linfocitos T CD4⁺. La cuantificación de este experimento no mostró diferencias significativas en la duración de los contactos entre los linfocitos T y las células dendríticas obtenidas del ratón heterocigoto, que fueron empleadas como control, y las obtenidas del ratón homocigoto (**Fig. 30 C y D**); aunque si se detectó una tendencia a una menor duración de la sinapsis en este último caso.



2.5. El bloqueo de CXCR4 produce una desorganización de la estructura de la sinapsis inmunológica

La sinapsis inmunológica presenta una estructura característica conocida como ojo de buey, en la que las moléculas que participan en la misma tienen una localización bien definida. Pueden formar parte del cSMAC, en la parte central de la estructura, como es el caso de CD3 o situarse en el anillo que rodea al cSMAC, conocido como pSMAC, como es el caso de la talina o del propio CXCR4.

Se empleó la línea celular Jurkat, electroporada con CXCR4-AcGFP y sorteada, para seleccionar las células apropiadas, para estudiar la estructura de la sinapsis inmunológica, y la distribución del receptor CXCR4 en la misma, mediante la técnica de TIRFM. Para ello, recurrimos a la formación de bicapas lipídicas planas artificiales que contenían moléculas de ICAM-1 (150 moléculas/ μ^2), moléculas de un anticuerpo anti-CD3 (30 moléculas/ μ^2), para desencadenar la formación de la sinapsis, y en algunos casos la quimioquina CXCL12. Las moléculas del anticuerpo anti-CD3 mono biotiniladas nos permitieron diferenciar el cSMAC.

En primer lugar, se observó que en ausencia del anticuerpo anti-CD3, es decir, sin que hubiera formación de sinapsis inmunológica; y tanto en presencia como en ausencia de CXCL12, las partículas de CXCR4-AcGFP ocupaban toda la superficie de la célula observada en el plano de

contacto con la bicapa lipídica (**Fig. 31 A y B y Vídeos 5 y 6**). En cambio, cuando estuvo presente el anticuerpo anti-CD3, la formación de la sinapsis inmunológica provocó que la mayor parte de las partículas de CXCR4-AcGFP se concentraran en el pSMAC (**Fig. 31 C, D y E y Vídeos 7 y 8**), pareciendo indicar que su distribución depende de la activación del TCR. Además, con este sistema pudimos apreciar también, que la presencia de CXCL12 aumentaba el tamaño e intensidad de las partículas de CXCR4-AcGFP detectadas (**Fig. 31 F**).

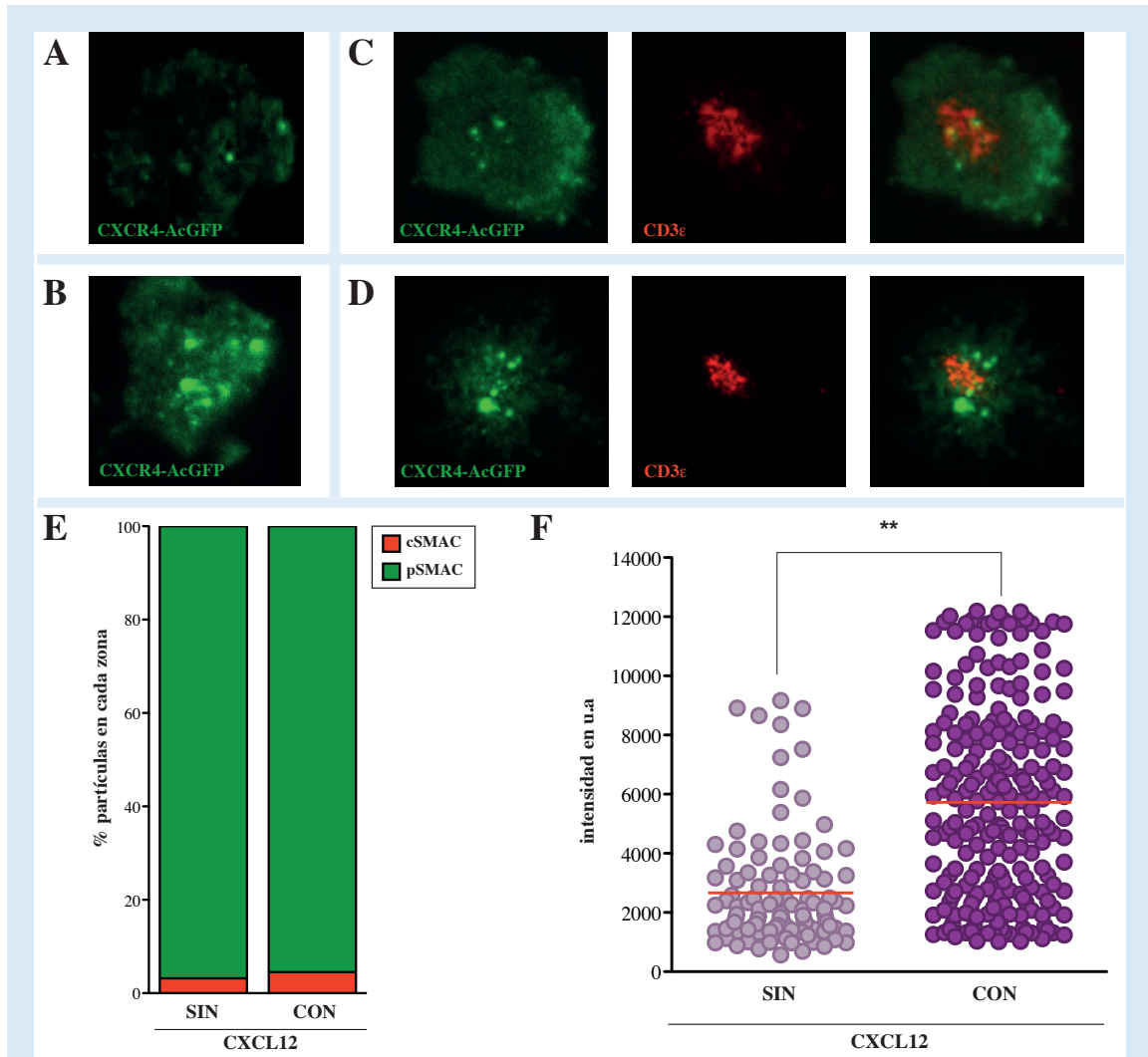


Figura 31. Estudio de la localización e intensidad de las partículas de CXCR4-AcGFP expresadas en células Jurkat que están formando sinapsis inmunológicas en bicapas lipídicas. Imágenes representativas de los vídeos realizados con la técnica de TIRFM en los que se han formado sinapsis inmunológicas con células Jurkat electroporadas con ADN de CXCR4-AcGFP en bicapas lipídicas artificiales en (**A**) ausencia de anti-CD3 y ausencia de CXCL12 (**B**) ausencia de anti-CD3 y presencia de CXCL12, (**C**) en presencia de anti-CD3 y ausencia de CXCL12 y (**D**) en presencia de anti-CD3 y presencia de CXCL12. (**E**) Cuantificación de los vídeos en los que se han formado sinapsis inmunológicas en presencia de anti-CD3 expresada en porcentaje según el número de partículas detectadas de CXCR4-AcGFP presentes en cada zona de la sinapsis inmunológica, en el SMAC central (cSMAC, rojo) y en el SMAC periférico (pSMAC, verde), en ausencia y presencia de CXCL12. (**F**) Representación de la intensidad medida en unidades arbitrarias (u.a) de las partículas de CXCR4-AcGFP detectadas con el sistema de análisis en la zona del pSMAC en presencia de anti-CD3 y sin o con CXCL12. Cada símbolo representa una partícula y las barras rojas representan la media de cada grupo. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media de 3 experimentos independientes (** $p < 0,01$).

Con estos datos confirmamos que el receptor CXCR4 se sitúa en la zona del pSMAC como consecuencia de la activación del TCR, y que la presencia de CXCL12 favorece la formación de pequeñas agrupaciones del receptor en esta zona.

Dado que la inhibición del eje CXCR4/CXCL12 reducía la duración de los contactos estables, nos preguntamos si la causa podría radicar en que se producía una alteración en la estructura de la sinapsis.

Para poder observar la estructura de ojo de buey y facilitar su estudio, se recurrió a sustituir las células dendríticas por microesferas de látex tapizadas con un anticuerpo anti-CD3 ϵ , y se añadió de manera exógena CXCL12 en algunos casos. Así, los linfocitos T CD4 $^{+}$ vírgenes purificados fueron pre-tratados o no con los inhibidores AMD3100 o PTx, y se formaron conjugados con las microesferas de látex descritas, para después depositarlos, en cubres tapizados previamente con poli-L-lisina, y realizar inmunofluorescencias utilizando anticuerpos específicos para marcar CD3 ζ , como localizador del cSMAC, y CXCR4 o talina para estudiar el pSMAC. Las inmunofluorescencias se observaron con un microscopio confocal DMI6000 Leica y se tomaron imágenes para su análisis.

En primer lugar, se estudió si el cSMAC se encontraba alterado, y para ello analizamos las imágenes obtenidas de las inmunofluorescencias realizada con el anticuerpo anti-CD3 ζ . La cuantificación de estas imágenes se llevó a cabo estableciendo un ratio entre la intensidad media de fluorescencia de este marcador en el linfocito en la zona de contacto entre el linfocito y la microesfera, y la intensidad media de fluorescencia del marcador en todo el linfocito (ratio en función de la localización en la IS), de modo que sólo en los casos donde el valor fue superior 1 existía una mayor concentración del marcador en la zona de contacto. Este ratio mostró, que en los linfocitos sin tratar, conjugados con las microesferas tapizadas con anti-CD3 ϵ y a los que añadimos CXCL12, CD3 ζ se localiza en el cSMAC, pero el pre-tratamiento con AMD3100 o PTx reduce su presencia (**Fig. 32 A**). Es decir, la inhibición del eje CXCR4/CXCL12 desorganiza la estructura de la sinapsis impidiendo el reclutamiento de CD3 ζ al cSMAC.

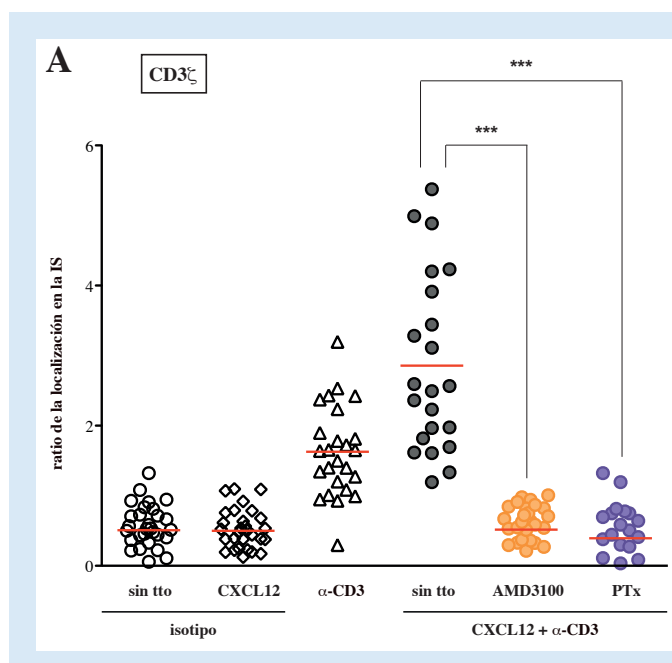


Figura 32. Estudio de la estructura de sinapsis inmunológicas formadas entre microesferas de látex y linfocitos T CD4 $^{+}$ con el eje CXCR4/CXCL12 bloqueado. (A) Cuantificación de la IMF en inmunofluorescencias marcadas con el anticuerpo anti-CD3 ζ en sinapsis formadas por linfocitos T CD4 $^{+}$ sin tratar, o pre-tratados con AMD3100 o PTx y microesferas de látex tapizadas con un anticuerpo anti-CD3 ϵ o su anticuerpo de isotipo y en presencia o ausencia de CXCL12. La gráfica expresa el ratio entre la IMF en la zona de contacto entre el linfocito y la microesfera y la IMF presente en todo el linfocito. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media de 3 experimentos independientes (***) $p < 0,001$.

Una vez estudiado y visto una alteración en el cSMAC, se pasó a un estudio más exhaustivo del pSMAC, empleando como marcadores la talina y CXCR4.

La evaluación de las inmunofluorescencias reveló que sin CXCL12 ni activación del TCR, no se observa formación de anillos, ni colocalización de talina y CXCR4, lo que se refleja en el perfil generado en la zona de contacto entre el linfocito y la microesfera. La adición de CXCL12 mejoró el perfil y por lo tanto la localización de los marcadores en el pSMAC, pero no se consigue una estructura completamente definida, por lo que podemos afirmar que en ausencia de activación del TCR no hay formación de sinapsis (**Fig. 32 B**).

Cuando se exponen linfocitos T CD4⁺ sin tratar y microesferas tapizadas con anti-CD3, ya se observa cierta colocalización de la talina y CXCR4, que sin embargo no fue completa hasta completa añadir CXCL12, como podemos apreciar claramente en el perfil formado en la zona de contacto entre el linfocito y la microesfera, y en la reconstrucción en 3D (**Fig. 32 B**).

En cambio, los conjugados formados entre linfocitos tratados con AMD3100 o con PTx y microesferas tapizadas con anti-CD3, en presencia de CXCL12, no se observó ni colocalización, ni la estructura característica de la sinapsis inmunológica, apreciándose una desorganización total (**Fig. 32 B**).

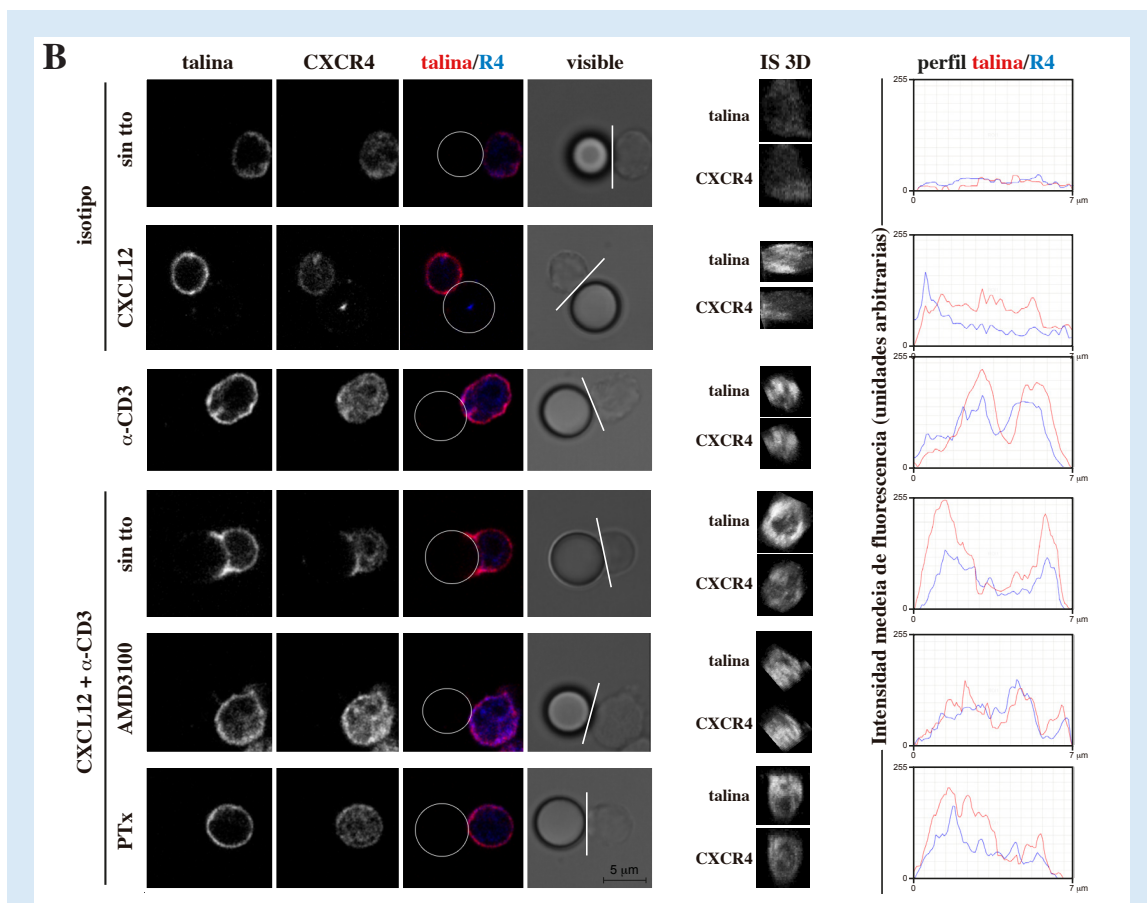


Figura 32. Estudio de la estructura de sinapsis inmunológicas formadas entre microesferas de látex y linfocitos T CD4⁺ con el eje CXCR4/CXCL12 bloqueado. (B) Imágenes representativas de inmunofluorescencias de conjugados formados como se explica en el apartado (A) marcadas con anticuerpos anti-talina (rojo) y anti-CXCR4 (azul). También se muestra la reconstrucción en 3D de la zona de contacto y el perfil que se obtiene de ambos marcadores en esta zona.

Para la cuantificación en todos los casos de las imágenes se realizó un ratio entre la intensidad media de fluorescencia situada en el pSMAC, frente a la situada en cSMAC de cada marcador (ratio de la IMF pSMAC/cSMAC), siendo este coeficiente superior a 1 en los casos de los marcadores del pSMAC (CXCR4 y talina) (Fig. 32 C).

Estos datos se confirmaron al realizar un ratio entre la intensidad media de fluorescencia del marcador en la zona de contacto entre el linfocito y la microesfera y la intensidad media de fluorescencia del marcador presente en toda la célula. En este análisis se apreció colocación de talina y CXCR4 en el pSMAC, únicamente en los conjugados formados entre los linfocitos sin tratar y las microesferas tapizadas con anti-CD3, detectando que la presencia de CXCL12 originaba una mayor acumulación en la zona de contacto, es decir desencadenaba la redistribución hacia esta zona de ambas moléculas (Fig. 32 D).

Podemos concluir por lo tanto que la señalización a través del eje CXCR4/CXCL12 colabora en la correcta formación de los anillos característicos de la sinapsis inmunológica.

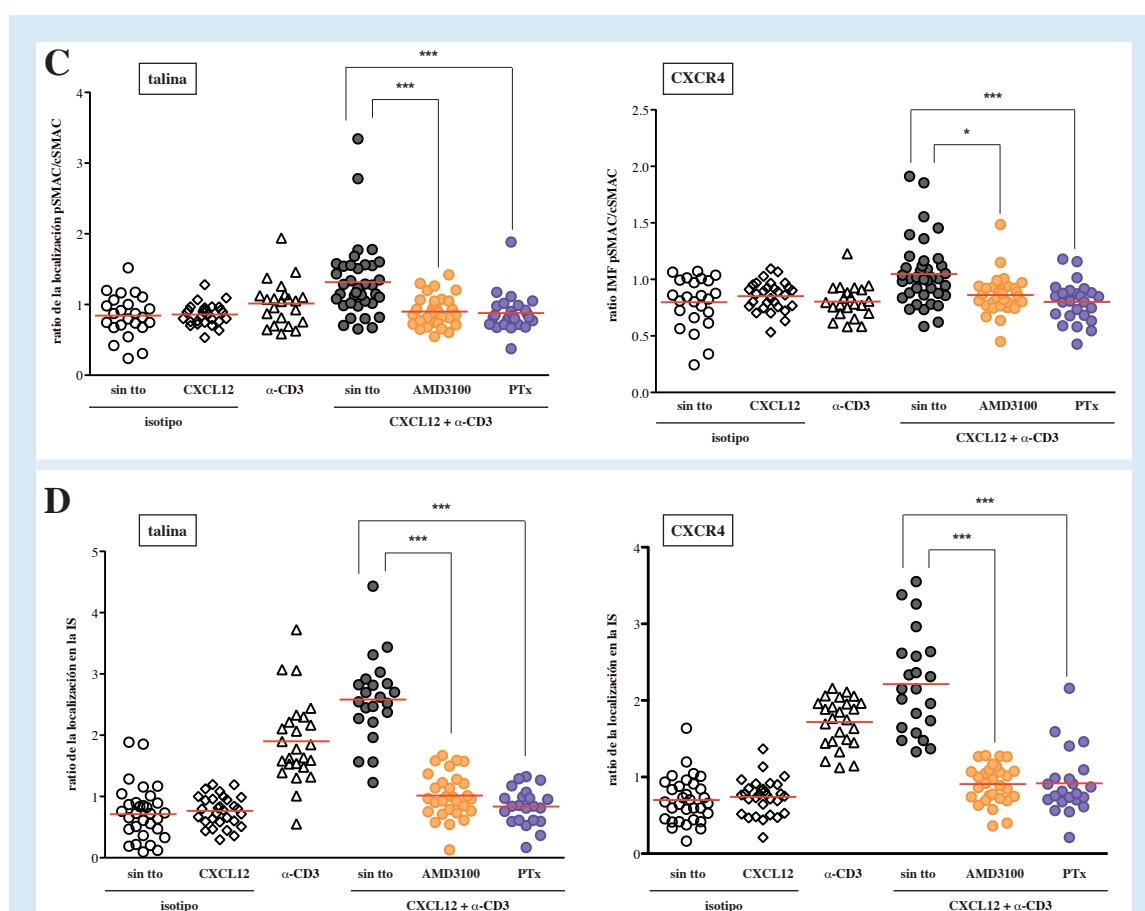


Figura 32. Estudio de la estructura de sinapsis inmunológicas formadas entre microesferas de látex y linfocitos T CD4⁺ con el eje CXCR4/CXCL12 bloqueado. (C) Cuantificación de la IMF de las inmunofluorescencias del apartado (B) marcadas con el anticuerpo anti-talina o anti-CXCR4. En la gráfica se representa el ratio entre la IMF en la zona de del pSMAC y la IMF del cSMAC de cada marcador. **(D)** Cuantificación de la IMF de las inmunofluorescencias del apartado (B) marcadas con el anticuerpo anti-talina o anti-CXCR4. En la gráfica se representa el ratio entre la IMF en la zona de contacto entre el linfocito y la microesfera y la IMF presente en todo el linfocito. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media de 3 experimentos independientes (***) p<0,001).

2.6. La inhibición de la señalización activada por la unión de CXCL12 a su receptor CXCR4 provoca defectos en la activación y proliferación del linfocito T

El objetivo principal de la sinapsis inmunológica es la activación del linfocito y su posterior diferenciación y proliferación. Como el bloqueo de la señalización activada por la unión de CXCL12 a CXCR4 provoca una desorganización en la estructura de la sinapsis, nos preguntamos si esto tendría efectos sobre la activación y proliferación del linfocito T.

2.6.1. Estudio del efecto de la inhibición del eje CXCR4/CXCL12 sobre la activación del linfocito T CD4⁺ presente en la sinapsis inmunológica

Una vez que se ha formado la sinapsis inmunológica y se desencadena la señalización a través de la activación del TCR, se va a producir la fosforilación y la relocalización de diversas moléculas de señalización que interaccionarán con el complejo TRC-CD3 (Mittelbrunn et al. 2009). Estudiamos entonces si como consecuencia de la formación de la sinapsis con células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ pre-tratado con AMD3100, o con PTx, o sin pre-tratar, se altera la tinción con un anticuerpo específico anti-fosfotirosina (pTyr), tomándolo como marcador de activación. Se midió la tinción de este anticuerpo por citometría de flujo a los 5 y 30 minutos de formar los conjugados. El resultado mostró que durante los primeros minutos, la expresión de fosfotirosina fue muy similar en los linfocitos control y en los linfocitos tratados con los inhibidores, pero según avanzó el tiempo, los linfocitos tratados con los inhibidores no fueron capaces de mantener esta activación y la tinción disminuyó (Fig. 33 A).

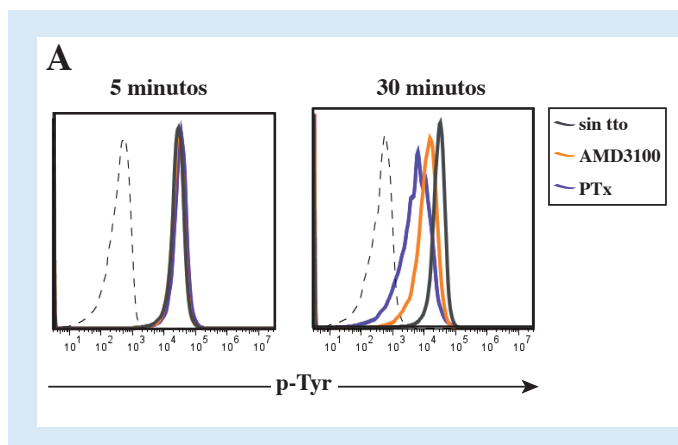
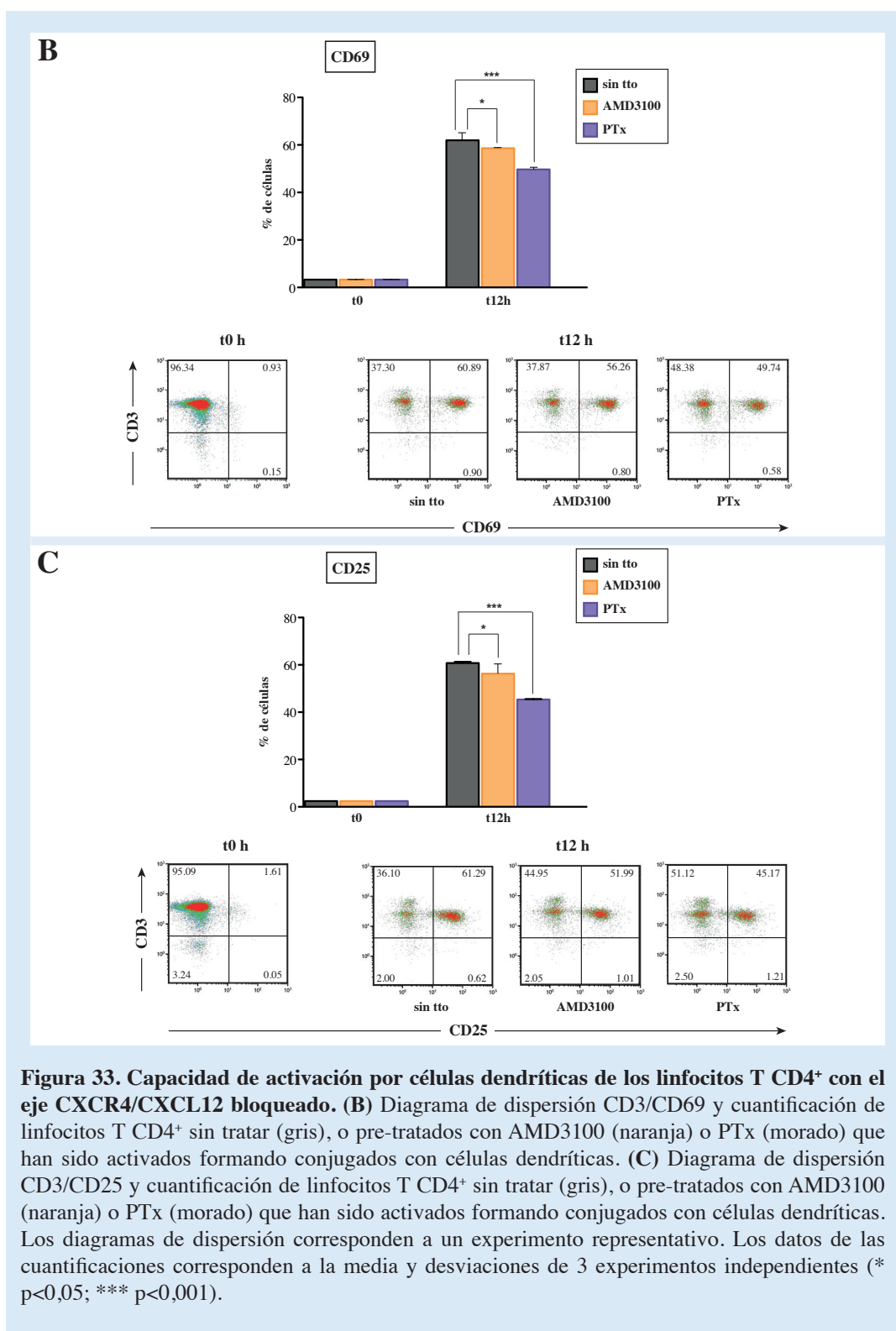


Figura 33. Capacidad de activación por células dendríticas de los linfocitos T CD4⁺ con el eje CXCR4/CXCL12 bloqueado. (A) Perfil de expresión representativo de p-Tyr a 5 y 30 minutos en linfocitos T CD4⁺ sin tratar (gris), o pre-tratados con AMD3100 (naranja) o PTx (morado) que han sido activados formando conjugados con células dendríticas.

Viendo que los linfocitos tratados en un primer momento si son capaces de activarse, pero presentan problemas para mantener la activación en el tiempo, estudiamos si este efecto tenía consecuencias en la activación, propiamente dicha, del linfocito T. Los datos de citometría sobre los linfocitos T CD4⁺ formando conjugados con las células dendríticas maduras y cargadas, demostraron que su pre-tratamiento con AMD3100 o con PTx originaba menores niveles de CD69 y CD25 (marcadores de activación) en los linfocitos T, comparados con los niveles de los linfocitos que no habían sido tratados (Fig. 33 B y C).



2.6.2. Estudio del efecto de la inhibición del eje CXCR4/CXCL12 sobre la proliferación del linfocito T CD4⁺ activado en la sinapsis inmunológica

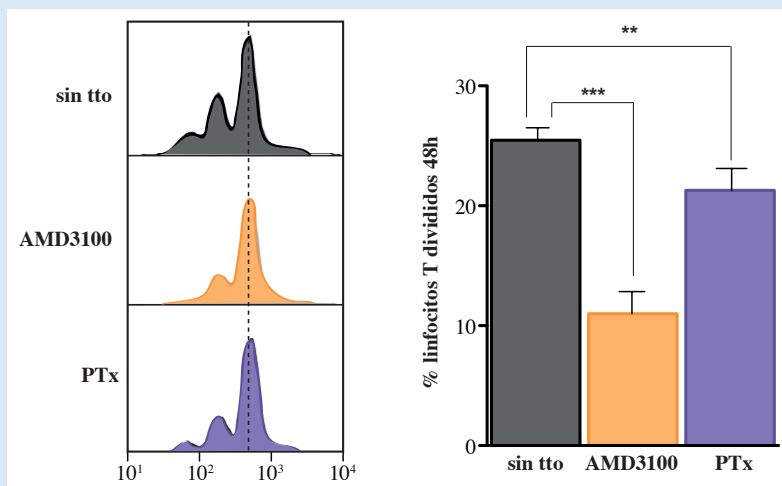
De manera paralela al experimento anterior, y habiendo comprobado un defecto en la activación de los linfocitos tratados con los inhibidores, pasamos a estudiar si la proliferación de estos linfocitos también se encontraba alterada. Los linfocitos fueron marcados

con una sonda de color violeta (CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit), que nos permitió estudiar su capacidad de proliferación mediante citometría de flujo, ya que con cada división el color de la sonda se diluye proporcionalmente. Tras marcar los linfocitos con la sonda, fueron pre-tratados o no con los inhibidores AMD3100 y PTx, y se formaron los conjugados con las células dendríticas maduras y cargadas con el péptido específico de OVA.

Los resultados mostraron que a las 48 horas los linfocitos T pre-tratados con AMD3100 y con PTx proliferan menos que los linfocitos T sin tratar (**Fig. 34**).

El estudio de la activación a tiempos cortos (5 y 30 minutos), mediante el marcaje de fosfotirosina, y a tiempos más largos (12 horas) a través de la expresión de CD69 y CD25, así como de su capacidad proliferativa a las 48 horas, nos permite concluir que el defecto en la organización de la estructura sináptica, provocado por la inhibición de la señalización de CXCR4, origina una disminución en la capacidad de activación del linfocito T, que se traduce en un defecto en su capacidad de proliferación.

Figura 34. Capacidad proliferativa de los linfocitos T CD4⁺ con el eje CXCR4/CXCL12 bloqueado. Perfil de proliferación representativo y cuantificación de los linfocitos T CD4⁺ sin tratar (gris), o pre-tratados con AMD3100 (naranja) o PTx (morado) que han sido activados formando conjugados con células dendríticas que se han dividido a las 48 horas tras la formación de los conju-



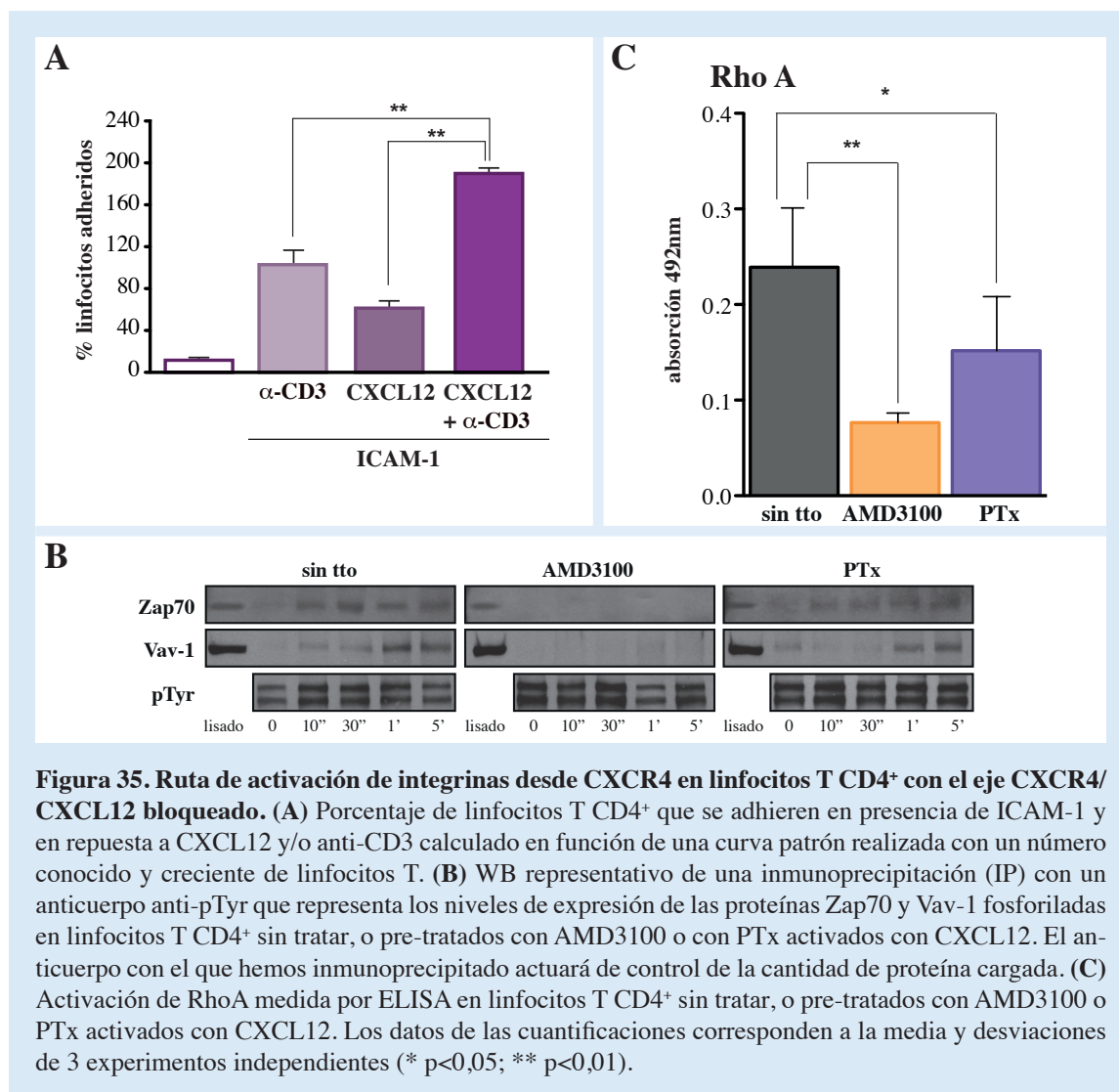
gados. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.7. Ruta de señalización implicada en la activación de las integrinas desencadenada por CXCL12

La disminución en la duración de los contactos en las sinapsis al alterar la señalización de CXCR4 nos llevó a pensar que las sinapsis que se formaban no eran estables, provocando que las células implicadas se separaran prematuramente. En la sinapsis inmunológica, la activación de las integrinas es un paso clave para la estabilización (Grakoui et al. 2015), y se desencadena a través de la activación del TCR, o de la activación de los receptores de quimioquinas (Mueller et al. 2004, Friedman et al. 2006).

La realización de un experimento de adhesión estática nos permitió comprobar que los linfocitos T CD4⁺ se adherían a placas previamente tapizadas con ICAM-1, tanto cuando los linfocitos habían sido pre-tratados con CXCL12, como cuando la placa estaba tapizada con un anticuerpo anti-CD3. Esta capacidad de adhesión aumentó de manera significativa cuando ambos estímulos

se aplicaron juntos, concluyendo que la activación de LFA-1 desencadenada por la activación del TCR se ve reforzada cuando a la vez se estimulaba CXCR4 (**Fig. 35 A**).



2.7.1. Moléculas implicadas en la activación de integrinas desde el receptor de quimioquinas

La activación de las integrinas desde el receptor de quimioquinas implica la activación de Zap70 que fosforila a Vav-1 y activa a RhoA (Garcia-Bernal et al. 2009), de modo que estudiamos el efecto de los inhibidores de la activación de CXCR4 en esta cascada de señalización. Para ello los linfocitos T CD4⁺ purificados sin pre-tratar o pre-tratados con los inhibidores AMD3100 o PTx fueron estimulados a distintos tiempos con CXCL12 a una concentración de 50nM. Los linfocitos activados fueron lisados para evaluar la fosforilación de Zap70, de Vav-1 y de RhoA. En los linfocitos sin tratar la estimulación con CXCL12 desencadenó rápidamente la fosforilación de Zap70, así como la activación de RhoA, procesos que se vieron reducidos en los linfocitos pre-tratados con AMD3100 o con PTx (**Fig. 35 B y C**). La fosforilación de Vav-1 también se desencadenó rápidamente tras la estimulación con CXCL12 en los linfocitos sin tratar, sin embargo se bloqueó por completo en los linfocitos

pre-tratados con AMD3100, y sólo se redujo parcialmente en los linfocitos pre-tratados con la PTx (**Fig. 35 B y C**). Teniendo en cuenta que la PTx inhibe la activación de la proteína Gi, este resultado indica que la señalización desencadenada por la unión de CXCL12 a CXCR4 y que tiene como efecto final la activación de las integrinas, además de señalizar a través de la proteína G, lo hace también por otra ruta de señalización independiente de la proteína G.

Este resultado concuerda con resultados previamente publicados que describen esta ruta, y sugieren que la unión de CXCL12 a CXCR4 activa a la proteína G, y en consecuencia también lo hace PLC, aumentando el flujo de calcio intracelular, y provocando la activación de RhoA, que conduce a la activación de la integrina. Pero en paralelo también se produce la activación de JAK, que vía la fosforilación de Vav-1 conduce también de modo redundante a la activación de RhoA, y de nuevo a la integrina (Bolomini-Vittori et al. 2009).

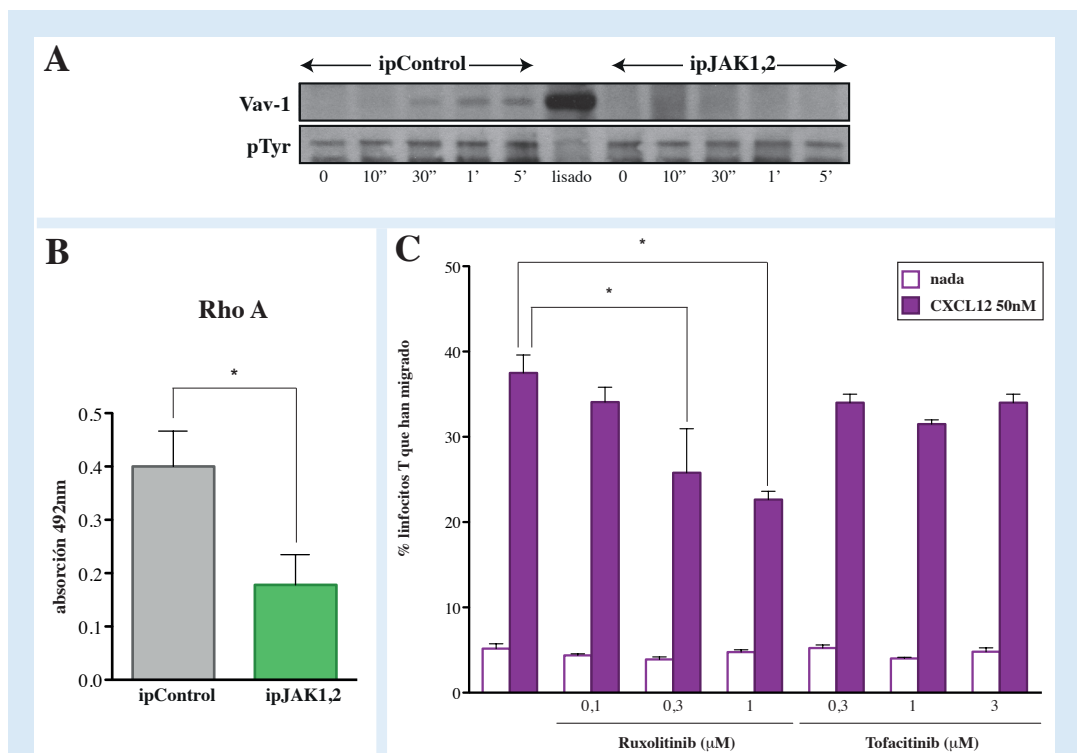


Figura 36. Ruta de activación de integrinas desde CXCR4 en linfocitos T CD4⁺ con la expresión de las Janus quinasas reducida o con su actividad inhibida. (A) WB representativo de una IP con un anticuerpo anti-pTyr que representa los niveles de expresión de Vav-1 fosforilada en linfocitos T CD4⁺ nucleofectados con el ARNip control (ipControl) y nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (ipJAK1,2). El anticuerpo con el que hemos inmunoprecipitado actuará de control de la cantidad de proteína cargada. (B) Activación de RhoA medida por ELISA en linfocitos T CD4⁺ nucleofectados con el ARNip control (ipControl) y nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (ipJAK1,2) activados con CXCL12. (C) Porcentaje de infocitos T CD4⁺ pre-tratados con un inhibidor de JAK1 y JAK2 (Ruxolitinib) o con un inhibidor de JAK3 (Tofacitinib) que migran en respuesta a CXCL12 (morado) en cámaras de Boyden tapizadas con ICAM-1. El porcentaje se calcula estableciendo un ratio entre los linfocitos que migran con quimioquina y los que migran sin. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (* p<0,05).

Para confirmar la implicación de las Janus quinasas en la activación de las integrinas, se estimularon linfocitos T CD4⁺ purificados con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida, con CXCL12 (50nM) a distintos tiempos, y tras lisarlos se estudió la fosforilación de Vav-1 y la activación de RhoA. Así comprobamos que en estos linfocitos la fosforilación de Vav-1 se encontraba totalmente abolida (**Fig. 36 A**), mientras que la activación de RhoA sólo estaba disminuida respecto a los linfocitos control (**Fig. 36 B**).

También se evaluó la capacidad de migración de los linfocitos T CD4⁺ en placas de Transwell, con los filtros tapizados con ICAM-1 y un gradiente de CXCL12 (50nM). Los linfocitos T purificados no se trataron o se pre-trataron con distintas concentraciones de inhibidores específicos de las Janus quinasas, el Ruxolitinib, inhibidor de JAK1 y JAK2 (Verstovsek et al. 2010), y el Tofacitinib, inhibidor de JAK3 (Changelian et al. 2003). Los resultados mostraron que sólo existían diferencias significativas en la capacidad de migración en los linfocitos tratados con el Ruxolitinib, es decir, en aquellos en los que se habían inhibido a JAK1 y JAK2 (**Fig. 36 C**).

Estos resultados confirmaron los datos del primer objetivo de esta tesis demostrando que JAK participa en la conexión existente entre los receptores de quimioquinas y las integrinas

2.8. La reducción de JAK1 y JAK2 impide la correcta formación de la sinapsis inmunológica

Se formaron conjugados entre linfocitos T CD4⁺ vírgenes purificados a partir del bazo y ganglios linfáticos periféricos (ALN, ILN y MLN) de ratones OT2, y células dendríticas derivadas de monocitos obtenidos de médula ósea, maduras con LPS y cargadas con el péptido de OVA 323-339, en un ratio 5:1. En este caso los linfocitos fueron pre-tratados con el Ruxolitinib, inhibidor de JAK1 y JAK2 o con el inhibidor de JAK3 Tofacitinib, y como control se emplearon linfocitos sin tratar.

La cuantificación de la translocación del MTOC a la zona de contacto entre las dos células mostró que sólo los linfocitos tratados con el Ruxolitinib, es decir aquellos en los que se había inhibido a JAK1 y JAK2, mostraban un defecto en la capacidad para translocar el MTOC, mientras que no hubo diferencias con el control al determinar la translocación del MTOC con el inhibidor de JAK3 (**Fig. 37 A**).

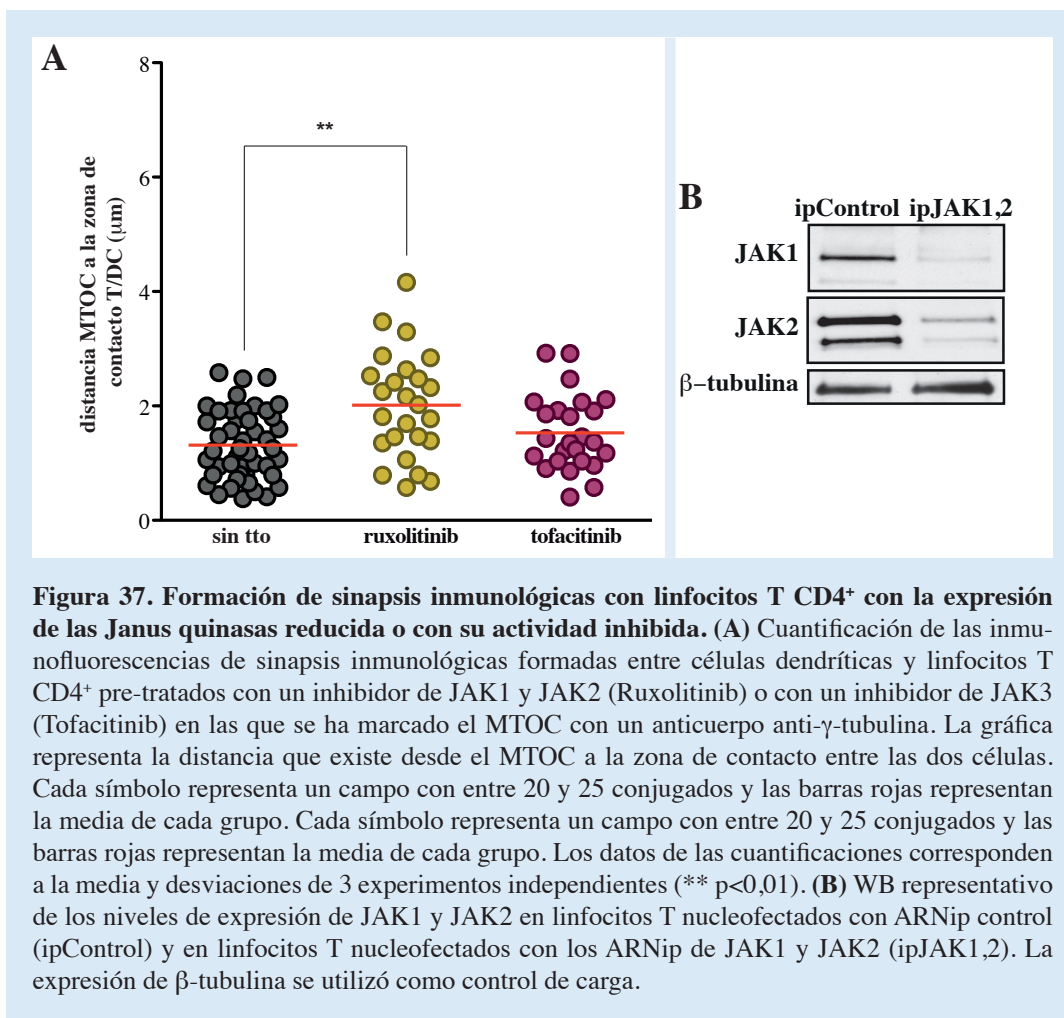
Estos resultados demuestran la implicación de JAK1 y JAK2 en la formación de la sinapsis inmunológica y se descarta la implicación de JAK3.

2.8.1. El número de sinapsis formadas por linfocitos T deficientes en JAK1 y JAK2 es menor

Para evitar los posibles efectos inespecíficos de los inhibidores químicos, decidimos continuar nuestro estudio reduciendo la expresión de JAK1 y JAK2 en los linfocitos T primarios nucleofectando dichas células. De modo que tras la purificación, los linfocitos se nucleofectaron con una mezcla ARNip no codificantes, que emplearíamos como control de nuestros experimentos, o con una mezcla de ARNip para JAK1 junto con una mezcla de ARNip para JAK2. La reducción de las dos quinasas se realizó a la vez y no por separado, basándonos en los resultados obtenidos en la primera parte de esta Tesis, donde demostramos

un efecto compensatorio entre ellas.

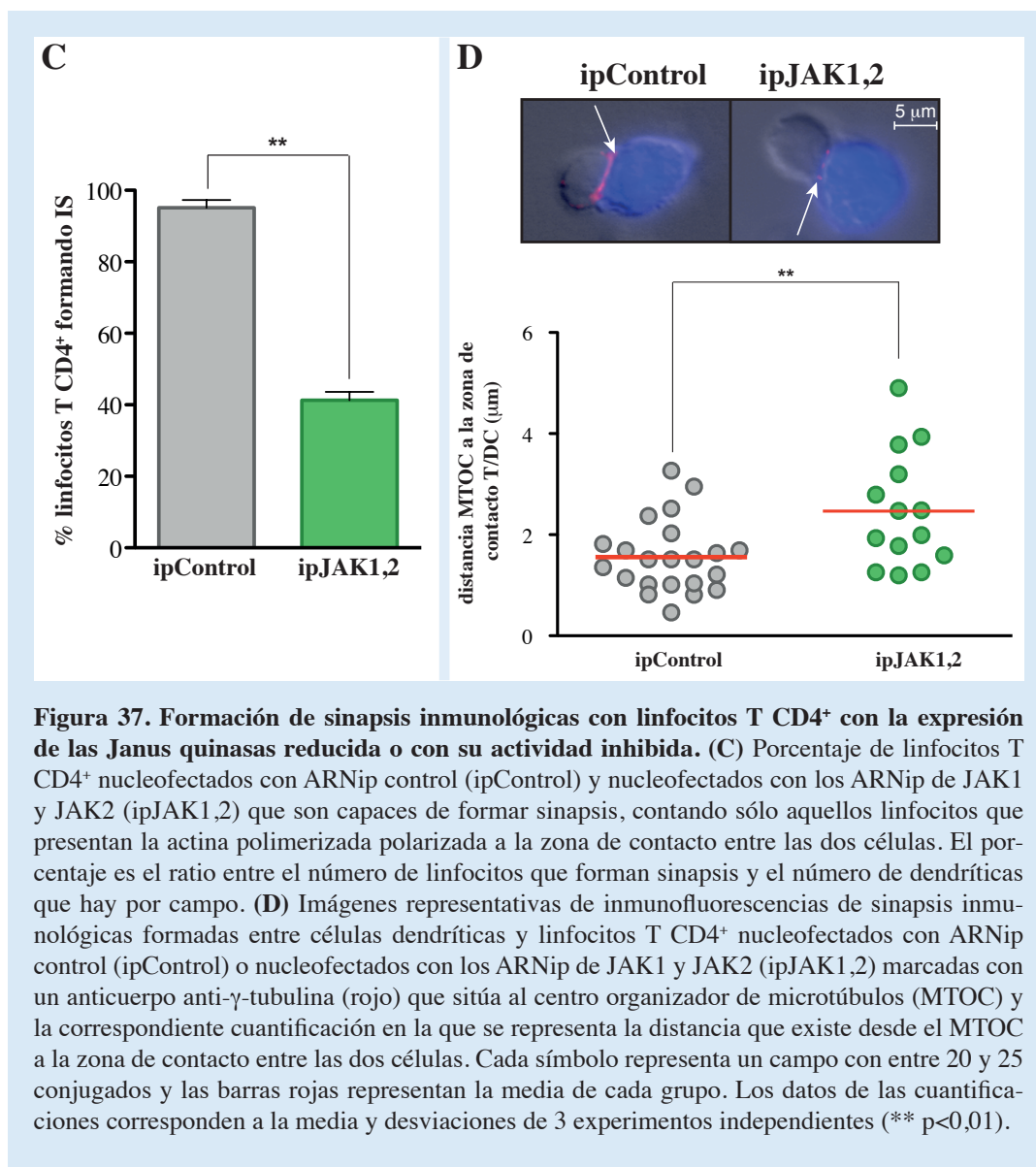
Tras 24 horas, necesarias para la reducción de la expresión de JAK1 y JAK2 en los linfocitos T CD4⁺, y comprobar esta reducción mediante Western Blot (**Fig. 37 B**), pasamos a realizar los conjugados con las células dendríticas derivadas de monocitos obtenidos de médula ósea, maduras con LPS y cargadas con el péptido de OVA 323-339, en un ratio de 5 :1. Los conjugados se formaron durante media hora y pasado este tiempo se realizó una inmunofluorescencia.



En primer lugar, se cuantificó el número de sinapsis que se formaban. Esta cuantificación se realizó de dos maneras distintas, mediante un marcaje con faloidina, que nos permitió localizar la actina polimerizada; y se contó como sinapsis aquella en la que el linfocito T tuviera la actina polimerizada polarizada a la zona de contacto entre las dos células. O mediante un marcaje con un anticuerpo anti-γ-tubulina, para medir la distancia a la zona de contacto del MTOC, teniendo en cuenta que en una sinapsis formada correctamente, debería translocarse a dicha zona. En la primera cuantificación, los resultados indicaron que $94.7 \pm 2.5\%$ de los linfocitos nucleofectados con el ARNip control formaban sinapsis, pero este porcentaje se reducía a un $41.3 \pm 3.0\%$ en el caso de los linfocitos nucleofectados con los ARNip de JAK1 y de JAK2 (**Fig. 37 C**). Este defecto se confirmó al cuantificar la translocación del MTOC. Los linfocitos T CD4⁺ con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida presentan un

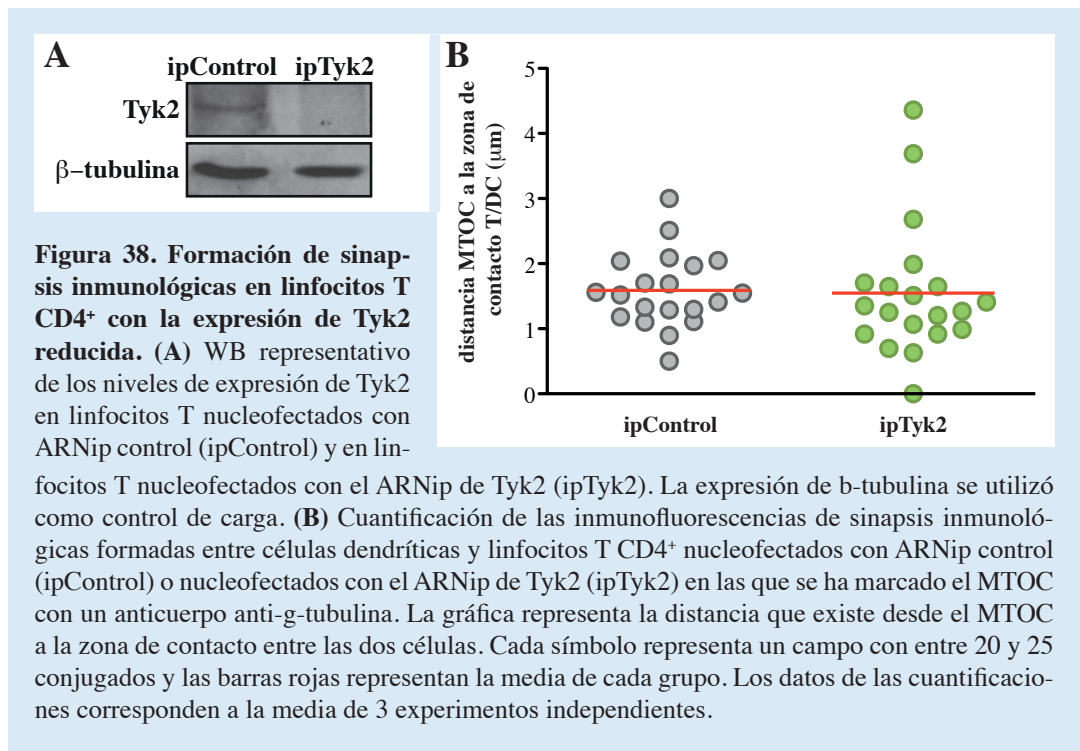
defecto en su capacidad para translocar el MTOC a la zona de contacto entre las dos células (**Fig. 37 D**).

El estudio de la capacidad para translocar el MTOC en las sinapsis formadas con linfocitos tratados con el inhibidor Tofacitinib, nos había permitido descartar la implicación de JAK3 en la formación de la sinapsis, pero la familia de las Janus quinasas tiene un cuarto miembro, Tyk2, por lo que antes de continuar nuestro estudio, decidimos estudiar la posible implicación de Tyk2 en el proceso.



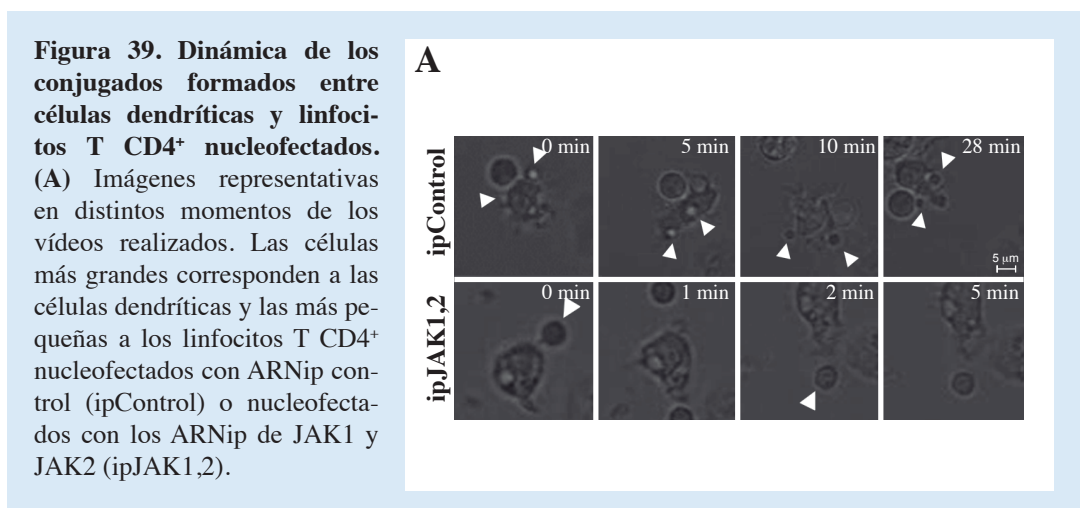
Para ello, los linfocitos T CD4⁺ se nucleofectaron con una mezcla de ARNip no codificantes, como control, o con una mezcla de ARNip para Tyk2. Se comprobó mediante Western Blot la reducción de la expresión de esta quinasa pasadas 24 horas (**Fig. 38 A**) y se realizaron conjugados como en anteriores ocasiones con células dendríticas. Los conjugados se fijaron y permeabilizaron y el marcaje con un anticuerpo anti-γ-tubulina, reveló que no existían diferencias significativas en la capacidad para translocar el MTOC a la zona de contacto entre los linfocitos nucleofectados con los ARNip control y los nucleofectados

con los ARNip para Tyk2 (**Fig. 38 B**). Descartando la participación de esta quinasa en la formación de la sinapsis.



2.8.2. La duración de los contacto entre linfocitos T CD4⁺ deficientes en JAK1 y JAK2 y células dendríticas es menor

Estudiamos también la dinámica de los conjugados por videomicroscopía. Las células dendríticas maduras y cargadas con el péptido de OVA 323-339, fueron depositadas sobre placas tapizadas con fibronectina, y sobre ellas se depositaron los linfocitos T CD4⁺ vírgenes previamente purificados y nucleofectados con los ARNip control, o con los ARNip para JAK1 y JAK2, empezando a tomar imágenes en ese mismo instante. La cuantificación de los vídeos se realizó siguiendo los contactos que establecía cada linfocito con las células dendríticas durante toda la grabación (90 minutos).



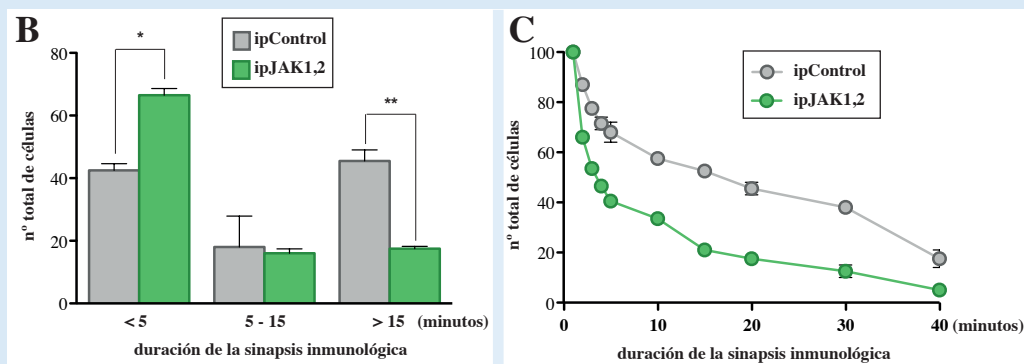


Figura 39. Dinámica de los conjugados formados entre células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ nucleofectados. (B) Cuantificación de los vídeos en la que se representa por grupos de tiempo la duración de los contactos que ejercen los linfocitos T CD4⁺ ipControl (gris) y los ipJAK1,2 (verde). (C) Cuantificación de los vídeos en la que se representa de manera acumulativa el número de linfocitos T CD4⁺ ipControl (gris) o ipJAK1,2 (verde) en función de la duración de los contactos con las células dendríticas. Se han contado 100 linfocitos con cada tratamiento. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Los resultados demostraron que la mayoría de los contactos que realizaban los linfocitos con la expresión de JAK1 y JAK2 disminuida eran de corta duración (< de 5 minutos) (**Fig. 39 A y B y Vídeos 9 y 10**), con una duración media de 4 ± 0.3 minutos (**Fig. 39 C**), mientras que la mayor parte de los linfocitos control realizaban contactos de larga duración (> de 15 minutos) y la media de su duración era mucho mayor (17 ± 0.4 minutos).

2.9. La reducción de JAK1 y JAK2 provoca la desorganización de la estructura de la sinapsis inmunológica

Del mismo modo que en el estudio con los inhibidores AMD3100 y PTx, quisimos estudiar si la falta de estabilidad de los contactos se debía a una desorganización en la estructura de la sinapsis. De nuevo, se sustituyó a la célula dendrítica por microesferas de látex, tapizadas con un anticuerpo anti-CD3 o con un anticuerpo del mismo isotipo que el anti-CD3, como control. Los linfocitos T CD4⁺ se nucleofectaron con los ARNip control o con los ARNip para JAK1 y JAK2 simultáneamente y se formaron los conjugados con las microesferas de látex, añadiendo o no CXCL12 (50nM). Los conjugados se depositaron sobre cubres previamente tapizados con poli-L-lisina y se realizaron inmunofluorescencias con distintos anticuerpos específicos.

Como marcador de cSMAC empleamos esta vez un anticuerpo anti-PKC θ . La cuantificación de las imágenes tomadas con un microscopio confocal DMI6000 Leica se llevó a cabo realizando un ratio entre la intensidad media de fluorescencia emitida por el anticuerpo anti-PKC θ en la zona de contacto entre el linfocito y la microesfera y la intensidad media de fluorescencia en todo el linfocito (ratio de la localización en la IS). Este parámetro sólo fue superior a 1, en los conjugados formados con las microesferas tapizadas con anti-CD3 a los que se añadió CXCL12, indicando que ambos son necesarios para la distribución de PKC θ en el cSMAC. Pero existen diferencias significativas en el valor de este parámetro entre los conjugados formados con los linfocitos nucleofectados con los ARNip control y los formados con los linfocitos deficientes en JAK1 y JAK2 que tienen un valor menor, mostrando una menor acumulación de PKC θ en la zona de contacto (**Fig. 40 A**).

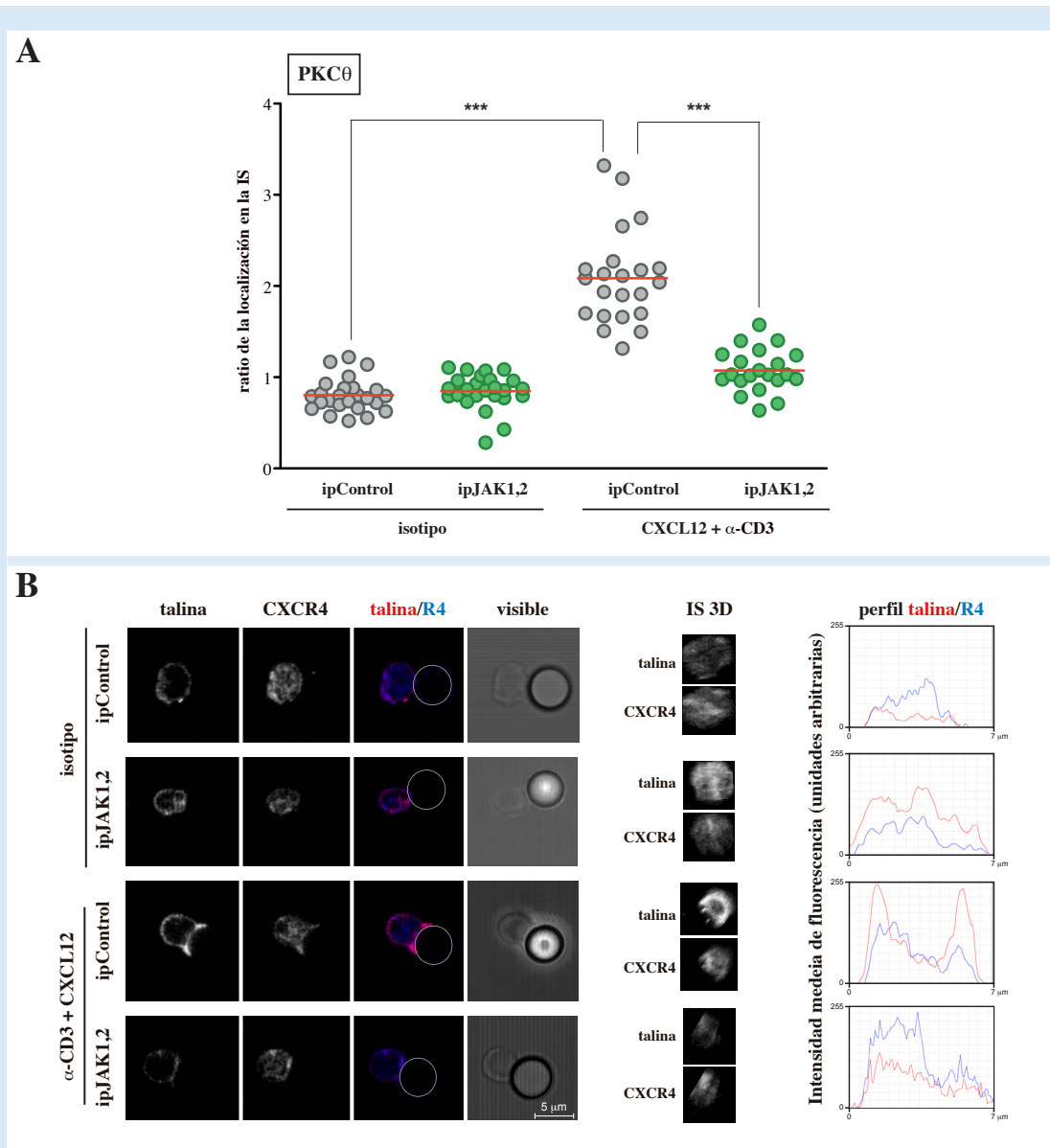


Figura 40. Estudio de la estructura de sinapsis inmunológicas formadas entre microesferas de látex y linfocitos T CD4⁺ nucleofectados. (A) Cuantificación de la IMF en inmunofluorescencias marcadas con el anticuerpo anti-PKCθ en sinapsis formadas por linfocitos T CD4⁺ nucleofectados con AR-Nip control (ipControl) o nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (ipJAK1,2) y microesferas de látex tapizadas con un anticuerpo anti-CD3ε o su anticuerpo de isotipo y en presencia o ausencia de CXCL12. La gráfica expresa el ratio entre la IMF en la zona de contacto entre el linfocito y la microesfera y la IMF presente en todo el linfocito. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media de 3 experimentos independientes (***) $p < 0,001$. **(B)** Imágenes representativas de inmunofluorescencias de conjugados formados como se explica en el apartado (A) marcadas con anticuerpos anti-talina (rojo) y anti-CXCR4 (azul). También se muestra la reconstrucción en 3D de la zona de contacto y el perfil que se obtiene de ambos marcadores en esta zona.

Una vez visto este defecto en el cSMAC, se estudió de manera detallada la distribución de marcadores del pSMAC, talina y CXCR4. En los conjugados con las microesferas tapizadas con el anticuerpo de isotipo, tanto los linfocitos nucleofectados con los ARNip control como los nucleofectados con los ANRip para JAK1 y JAK2, no mostraron la típica forma polarizada hacia la microesfera, indicando que en ese contacto no se estaba formando una sinapsis. Además, el perfil

que se obtuvo de CXCR4 y talina no correspondía al de una sinapsis correcta. Este perfil si se observó en los conjugados formados entre las microesferas tapizadas con anti-CD3 y los linfocitos nucleofectados con los ARNip control, pudiendo apreciar también que ambos marcadores colocalizaban en el pSMAC. Pero en el caso de los linfocito nucleofectados con los ARNip para JAK1 y JAK2 no se observó un perfil correcto de ninguno de los dos marcadores (**Fig. 40 B**).

La cuantificación de las imágenes estableciendo un ratio entre la intensidad media de fluorescencia emitida por cada marcador en el pSMAC, frente a la emitida en el cSMAC (ratio IMF pSMAC/cSMAC), determinó que para que se produzca una mayor concentración de los marcadores en el pSMAC, es decir, un valor superior a 1, fue necesario que las microesferas estuviesen tapizadas con anti-CD3 y la presencia de CXCL12 en los conjugados, y además, la correcta expresión de JAK1 y JAK2 (**Fig. 40 C**).

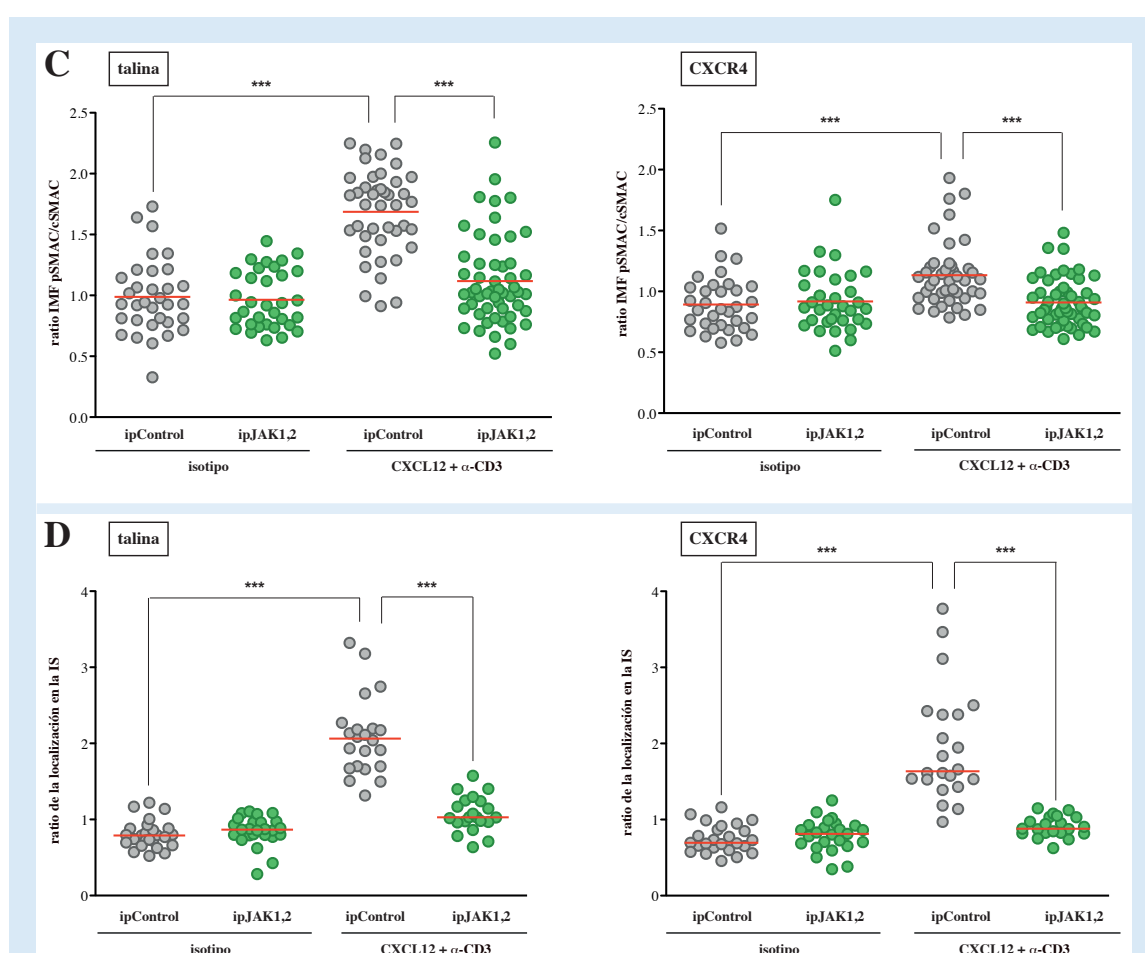


Figura 40. Estudio de la estructura de sinapsis inmunológicas formadas entre microesferas de látex y linfocitos T CD4⁺ nucleofectados. (C) Cuantificación de la IMF de las inmunofluorescencias del apartado (B) marcadas con el anticuerpo anti-talina o anti-CXCR4. En la gráfica se representa el ratio entre la IMF en la zona de del pSMAC y la IMF del cSMAC de cada marcador. **(D)** Cuantificación de la IMF de las inmunofluorescencias del apartado (B) marcadas con el anticuerpo anti-talina o anti-CXCR4. En la gráfica se representa el ratio entre la IMF en la zona de contacto entre el linfocito y la microesfera y la IMF presente en todo el linfocito. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media de 3 experimentos independientes (***) $p < 0,001$.

También se calculó el ratio entre la intensidad media de fluorescencia emitida por los marcadores en la zona de contacto entre el linfocito y la microesfera, y la intensidad media de fluorescencia en todo el linfocito (ratio de la localización en la IS), que nos permitió confirmar los resultados anteriores al mostrar que sólo los conjugados formados entre las microesferas tapizadas con anti-CD3, y los linfocitos nucleofectados con los ARNip control, en presencia de CXCL12, mostraban mayor ratio, indicando una mayor concentración en la zona de contacto entre los linfocitos T y las microesferas, tanto de talina como de CXCR4 (**Fig. 40 D**).

El estudio de la organización de la estructura de la sinapsis muestra que los linfocitos con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida presentan alteraciones en la distribución de marcadores específicos del cSMAC y del pSMAC, como sucedía al bloquear CXCR4, por lo que podemos concluir de estos ensayos que JAK1 y JAK2 participan en la correcta organización de la sinapsis inmunológica.

2.10.JAK1 y JAK2 son necesarios para una correcta activación y proliferación del linfocitos T después de la formación de la sinapsis

Teniendo en cuenta que en los conjugados formados con linfocitos T con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida, presentaban defectos en la estructura de la sinapsis, se estudió si la activación del linfocito T, como consecuencia de la sinapsis, también estaba afectada.

En primer lugar se estudió la capacidad de activación en un tiempo corto, 30 minutos tras formar el conjugado, midiendo por citometría de flujo y por inmunofluorescencia la expresión de fosfotirosina. La inmunofluorescencia nos permitió ver que los linfocitos deficientes en JAK1 y JAK2 presentaban una menor tinción del anticuerpo anti-pTyr en la zona de la sinapsis, y por citometría de flujo confirmamos que estos linfocitos expresaban menos fosfotirosina, sugiriendo una menor activación en estos linfocitos respecto a los controles (**Fig. 41 A y B**).

Para estudiar si este defecto se mantenía a lo largo del tiempo, nuevamente mediante citometría de flujo, se analizó la expresión de un marcador de activación más tardía, como es CD25. Se formaron conjugados del mismo modo que en los otros experimentos, y se mantuvieron al menos durante 12 horas, para luego marcar los conjugados con un anticuerpo anti-CD3 y así poder seguir exclusivamente a los linfocitos T, y con un anticuerpo anti-CD25. La cuantificación de este experimento mostró que el defecto en la activación de los linfocitos nucleofectados con los ARNip para JAK1 y JAK2 se mantenía a tiempos más largos (12 horas) (**Fig. 41 C**).

Por último y para finalizar el estudio, quisimos comprobar si la capacidad de proliferación de estos linfocitos T también se encontraba afectada. En este caso no pudimos recurrir a un estudio mediante citometría de flujo, ya que pasadas 48 horas de la nucleofección los niveles de JAK1 y JAK2 se recuperan, por lo que decidimos estudiar mediante una PCR cuantitativa los niveles de ARN mensajero de IL-2 que contenían los linfocitos. En este caso, los linfocitos nucleofectados tanto con los ARNip control, como con los ARNip de JAK1 y JAK2 se estimularon durante 24 horas en una placa tapizada con anti-CD3, para provocar la activación del TCR, y anti-CD28, como coestimulador de esta activación. La cuantificación de la Q-PCR mostró niveles significativamente menores de ARNm de IL-2 en los linfocitos nucleofectados con los ARNip para JAK1 y JAK2 (**Fig. 41 D**).

De estos resultados se deduce, que los defectos en la estructura de los conjugados formados con linfocitos deficientes en JAK1 y JAK2, se traducen en un defecto en su capacidad de activación y proliferación, mostrando la importancia de JAK1 y JAK2 en estos procesos.

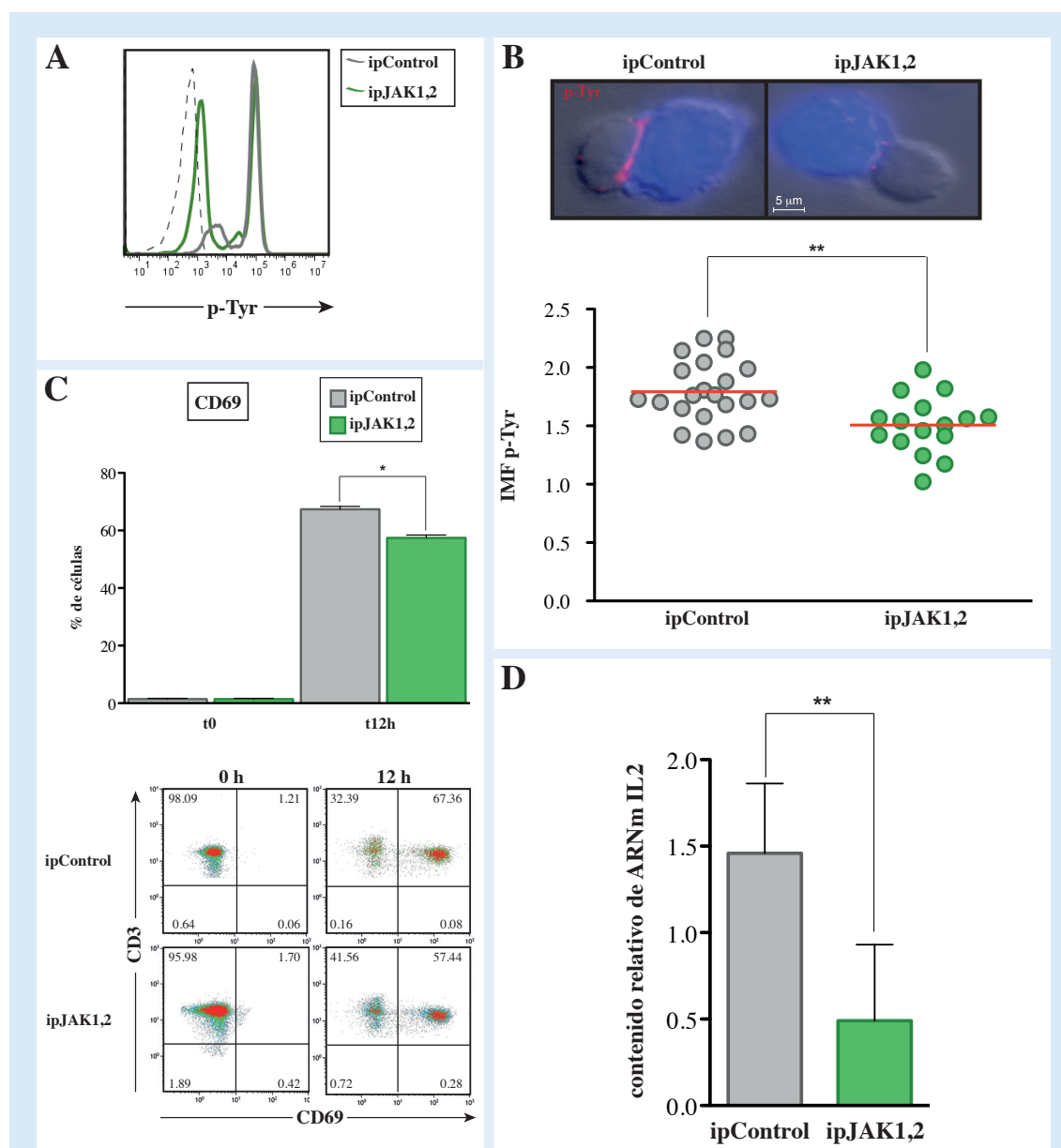


Figura 41. Capacidad de activación por células dendríticas de los linfocitos T CD4⁺ nucleofectados. (A) Perfil de expresión representativo de p-Tyr a 30 minutos en linfocitos T CD4⁺ nucleofectados con ARNip control (ipControl, gris) o nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (ipJAK1,2, verde) que han sido activados formando conjugados con células dendríticas. (B) Imágenes representativas de inmunofluorescencias de conjugados formados entre células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ ipControl o ipJAK1,2, en las que se ha marcado con un anticuerpo anti-p-Tyr. (rojo). La cuantificación representa la IMF del anticuerpo en la zona de contacto entre las dos células. Cada símbolo representa un campo con entre 20 y 25 conjugados y las barras rojas representan la media de cada grupo. (C) Diagrama de dispersión CD3/CD69 y cuantificación de linfocitos T CD4⁺ ipControl (gris) o ipJAK1,2 (verde) que han sido activados formando conjugados con células dendríticas. (D) Contenido relativo de ARN mensajero de IL-2, resultado de la Q-PCR de linfocitos T CD4⁺ ipControl o ipJAK1,2 que han sido activados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 horas. Los datos de las cuantificaciones corresponden a la media y desviaciones de 3 experimentos independientes (* p<0,05; ** p<0,01).

VIII. Discusión

El cuerpo humano a lo largo de su vida sufre continuas agresiones provocadas por agentes patógenos a los que hace frente el sistema inmunitario. Este sistema actúa con dos tipos de repuestas, una rápida e inespecífica, conocida como repuesta innata, y otra más lenta pero sin embargo muy específica, la repuesta adquirida. Las células que pertenecen a la repuesta innata, basan su actividad en el reconocimiento general de los agentes patógenos y en su fagocitosis, mientras que la repuesta adaptativa presenta la capacidad de generar una gran diversidad de receptores específicos de antígeno, presentes en los linfocitos B y T, y que dará lugar a la memoria inmunológica.

El correcto funcionamiento del sistema innato y del sistema adaptativo depende de la capacidad de movimiento de sus células, y de su capacidad para posicionarse en el tiempo y en el lugar adecuado. En este aspecto, las quimioquinas y sus receptores juegan un papel clave, tanto en los procesos de homeostasis, como en la respuesta inflamatoria (Zlotnik et al. 2012). Todas las células del sistema inmunitario expresan receptores de quimioquinas y los tejidos linfoides son productores de sus ligandos, dando a entender la importante función que el sistema quimioquina/receptor desarrolla en estos procesos.

Durante el desarrollo de esta tesis hemos centrado nuestro estudio en los receptores CXCR4 y CCR7, en su señalización tras la unión de sus ligandos, y en las funciones en las que están implicados, con especial interés en demostrar la relevancia que tiene para las quimioquinas una ruta compartida con las citoquinas, la ruta de las Janus quinasas.

CXCR4 es un receptor homeostático, expresado por multitud de tipos celulares y con un único ligando, CXCL12. La importancia de este eje se confirma al observar que los ratones deficientes en CXCL12, mueren en estado embrionario como consecuencia de defectos en la linfopoyesis de los linfocitos B, en la mielopoyesis en la médula ósea, y en la formación del septum cardiaco (Nagasawa et al. 1996). Los mismos defectos, junto a alteraciones en el desarrollo del cerebelo, pueden observarse en los ratones deficientes en CXCR4 (Zou et al. 1998, Sugiyama et al. 2006).

En el contexto del sistema inmunitario el par CXCR4/CXCL12 regula la movilización de los precursores hematopoyéticos. CXCR4 es expresado por las células madre hematopoyéticas formadas en la médula ósea, y CXCL12 es secretado por células estromales en esa misma localización. La unión de CXCR4 a CXCL12 retiene los precursores hematopoyéticos en la médula ósea hasta su completa diferenciación (Choi et al. 2012). En este sentido, un antagonista de CXCR4 que bloquea su unión a CXCL12, Plerixafor

(AMD3100), se utiliza en clínica para la movilización de precursores hematopoyéticos de la médula ósea en pacientes con mielomas múltiples, o linfomas no Hodgkin, antes de iniciar los tratamientos de quimioterapia (Fricker 2013, Fruehauf 2013).

CCR7, también es un receptor homeostático y tiene dos ligandos CCL19 y CCL21. Este receptor es imprescindible en la migración y recirculación de los linfocitos T vírgenes y de las células dendríticas a los órganos linfoides secundarios, así como en la organización interna de estos órganos (Hauser et al. 2016). Los ratones deficientes en CCR7 o en CCL19 y CCL21 presentan alteraciones en la generación de anticuerpos y por lo tanto, en la generación de la respuesta inmune adquirida, así como grandes defectos en la arquitectura de los órganos linfoides secundarios (Forster et al. 1999, Mori et al. 2001).

Los receptores de quimioquinas pertenecen a la familia de los GPCRs, son receptores formados por 7 dominios transmembrana que señalizan a través de proteínas G. La unión del ligando a su receptor provoca un cambio de conformación que permite desencadenar la señalización. En algunos casos concretos, CXCR4, CCR7, CCR2 y CCR5, y aunque no hay pruebas suficientes para saber si se trata de un proceso universal que ocurre en toda esta familia de receptores, se ha observado la activación de las Janus quinasas (Mellado et al. 1998, Rodríguez-Frade et al. 1999, Vila-Coro et al. 1999, Stein et al. 2003) de manera independiente a la proteína Gi, ya que éstas se siguen activando en células tratadas con PTx (Mellado et al. 1998).

Las Janus quinasas, son una familia de tirosinas quinasas formada por cuatro miembros JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2 que se expresan de manera ubicua en mamíferos. Participan en el crecimiento, desarrollo, supervivencia y diferenciación celular, ya que tienen un papel importante en la señalización intracelular de los receptores de citoquinas (Nicolas et al. 2012); pero también se ha visto que participan en la señalización desencadenada por GPCRs (Park et al. 2000), así ocurre por ejemplo tras activar al receptor de Angiotensina AT1 (Marrero et al. 1995), el receptor $\alpha 1$ adrenérgico (Sasaguri et al. 2000) o algunos receptores de quimioquinas (Mellado et al. 2001). Aunque muchos de estos estudios se han llevado a cabo en líneas celulares transfectadas, también hay estudios en células primarias que demuestran esta asociación (Soldavilla et al. 2004). En cualquier caso, la señalización de los receptores de quimioquinas a través de las Janus quinasas ha sido muy discutida, y también hay estudios contradictorios que demuestran que no están implicadas (Moriguchi et al. 2005). Estas diferencias pueden deberse al método experimental empleado, al uso de distintos tipos celulares o a que en la mayoría de los estudios se emplean inhibidores químicos, que no son siempre específicos. Además, en estos casos, hay que tener en cuenta que el bloqueo de las Janus quinasas afecta a la señalización por citoquinas y factores de crecimiento, por lo que muchas veces se compromete la viabilidad celular. Debe también considerarse que el bloqueo de JAK no implica una inhibición total de la señalización de las quimioquinas, ya que la señalización a través de la proteína G no se encuentra afectada.

Por todas estas razones nos propusimos estudiar en este proyecto la relevancia funcional de la ruta JAK/STAT en la señalización desencadenada por quimioquinas. Así, comenzamos estudiando el proceso homeostático de la extravasación de los linfocitos T vírgenes a los ganglios linfáticos.

En este contexto, trabajos anteriores habían relacionado a la Janus quinasa JAK3 en la maduración y

función de los linfocitos B y T (Thomis et al. 1997), y trabajos más recientes muestran que también tiene un papel importante en la migración mediada por CCR7 de los linfocitos T vírgenes a los ganglios linfáticos (García-Zepeda et al. 2007).

Ya que en estos estudios está definida la implicación de JAK3 en la migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos, y que para aumentar la supervivencia celular en los experimentos de nucleofección, para introducir el ARNip y reducir la expresión de JAK requeríamos la presencia de IL-7, una citoquina cuya señalización precisa de JAK3, decidimos centrar nuestro estudio en las quinasas JAK1 y JAK2. El uso de ratones sin la expresión de cualquiera de estas dos quinasas es inviable debido a que ambos ratones son letales en estado embrionario (Neubauer et al. 1998, Rodig et al. 1998), por ello decidimos usar la nucleofección con los ARNip de JAK1 y JAK2, que en nuestros experimentos redujo en aproximadamente un 60% la expresión de ambas quinasas en los linfocitos T vírgenes purificados.

Los linfocitos T con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida de manera simultánea, mostraron una reducción significativa en su capacidad de migración *in vitro* a las quimioquinas CXCL12 y CCL21. Pero este efecto no se produjo cuando sólo redujimos la expresión de una de las dos quinasas. Este resultado indica que existe un efecto de redundancia entre las dos quinasas y que no existe especificidad entre JAK y receptores de quimioquinas, al contrario de lo que ocurre en la señalización desde las citoquinas (O'Sullivan et al. 2007).

El proceso de extravasación es un proceso secuencial en el que los leucocitos interaccionan con las células endoteliales estableciendo uniones cada vez más estables. Tras los primeros choques con el endotelio, las células comienzan a rodar por la superficie del endotelio vascular y finalmente se produce su parada, adhesión firme y extravasación (Vestweber 2015). En el caso de la extravasación en los ganglios linfáticos esta parada se debe principalmente a la activación de la integrina LFA-1, inducida por la señalización desencadenada por el receptor CCR7, que permite la interacción de LFA-1 con su ligando en el endotelio. De hecho, la extravasación de los linfocitos T vírgenes en ratones *plt/plt* (sin expresión de CCL19 ni CCL21) se encuentra inhibida (Stein et al. 2000).

En nuestros experimentos *in vivo*, la entrada de los linfocitos T vírgenes en los ganglios linfáticos se ve afectada cuando reducimos la expresión de JAK1 y JAK2 de manera simultánea. No obstante, no se produce un bloqueo total, indicando que los otros miembros de las Janus quinasas pueden estar implicados. De hecho, trabajos anteriores han implicado a JAK3, en este proceso (García-Zepeda et al. 2007); o también podrías significar que hay rutas de señalización alternativas implicadas en el proceso independientes de las JAK.

En cambio, esta reducción en la migración no se observa cuando sólo disminuimos la expresión de una de las dos quinasas, confirmando así los resultados “*in vitro*”. El proceso de llegada a los ganglios linfáticos de los linfocitos T vírgenes es dependiente de CCR7 y de sus ligandos CCL19 y CCL21 (Comerford et al. 2013) y previamente ya se había demostrado que el bloqueo de JAK con un inhibidor químico lo afectaba (Stein et al. 2003). En el proceso, CXCR4 tiene solamente un papel cooperador, facilitando el proceso de migración de los linfocitos T y aumentando la polimerización de actina y la señalización desencadenada por CCR7 (Bai et al. 2009). Sin embargo, CXCR4 tiene un papel más importante en la migración a los ganglios linfáticos de un tipo de células de memoria, los linfocitos T CD8⁺ de memoria central (T_{CM}). Estos linfocitos

son capaces de adherirse y extravasarse a los ganglios linfáticos en ratones deficientes en CCL19 y CCL21, pero no cuando se emplean inhibidores de CXCR4 (Scimone et al. 2004).

Tras la extravasación y una vez dentro de los ganglios, los linfocitos se mueven de manera dirigida hasta situarse en zonas bien definidas. Estos gradientes están formados por CXCL13 y CXCL12 en el caso de los linfocitos B, y por CCL21, principalmente, CCL19 y CXCL12 en los linfocitos T (Schulz et al. 2016). Nuestros datos sobre el estudio de la localización y el movimiento de los linfocitos T vírgenes con la expresión de JAK1 y JAK2 disminuida en el interior de los ganglios, no mostraron diferencias con los linfocitos T control. Estos resultados nos llevan a pensar que JAK participa en el proceso de activación de las integrinas y que tal vez, en el interior del ganglio el movimiento no sea dependiente de integrinas. En este contexto, la activación de LFA-1 desde CCR7 parece estar influenciada por la resistencia que ejerce el linfocito cuando existe una corriente o flujo, como ocurre en las fases de la cascada de adhesión leucocitaria, pero que está ausente dentro del ganglio. Además, estudios realizados con ratones deficientes en LFA-1 no han mostrado diferencias en el movimiento de los linfocitos T dentro de los ganglios linfáticos (Woolf et al. 2007). También, habría que considerar la posibilidad de la existencia de otras rutas y moléculas implicadas en ese movimiento intraganglionar, ya que la presencia de CCR7 y de sus ligandos si que es crítica para el movimiento de los linfocitos T en la zona T (Worbs et al. 2007).

Descartamos que en nuestro caso sólo los linfocitos T que continuasen teniendo JAK1 y JAK2 fuesen los que entrasen en el ganglio al realizar estudios de PCR cuantitativa sobre las células llegadas, comprobando que también algunas células con los niveles de JAK1 y JAK2 reducidos alcanzaban el ganglio

La activación de las integrinas *inside-out*, es decir, a través en este caso de la señalización desencadenada por el receptor de quimioquinas, es un paso clave en la migración de los linfocitos a los ganglios linfáticos (Kinashi 2005).

La activación de la integrina LFA-1 en los linfocitos permite una adhesión firme a las células del endotelio vascular, que es necesaria para que el linfocito se pueda extravasar (Warnock et al. 1998). La importancia de LFA-1 en este proceso se confirma con los resultados obtenidos en experimentos de migración empleando ratones deficientes en LFA-1, que presentan un menor tamaño de los ganglios linfáticos, provocado por una menor capacidad de migración o *homing* de los linfocitos a los mismos (Berlin-Rufenach et al. 1999). Resultados muy similares se obtuvieron empleando anticuerpos bloqueantes de esta integrina (Hamann et al. 1988).

Nuestros experimentos de adhesión fueron realizados en tres condiciones distintas para simular varias situaciones que pudieran darse “in vivo”. En primer lugar, los estudios de adhesión en flujo mostraron diferencias en la capacidad de adhesión a ICAM-1 tras la estimulación con CXCL12 o con CCL21 entre los linfocitos T control y los linfocitos T con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida. Los niveles invariables de LFA-1 en ambas condiciones descartaron que un defecto en la expresión de las integrinas fuese responsable del efecto observado.

Por otro lado, los experimentos de adhesión en condiciones estáticas revelaron que los linfocitos T deficientes para JAK1 y JAK2, tras ser estimulados por CXCL12 y CCL21, se adhieren a ICAM-1 con menor

eficiencia que los linfocitos T control. Además, la ausencia de diferencias en la capacidad de adhesión entre los linfocitos T deficientes en las dos quinasas y los linfocitos T control tras el estímulo con un activador inespecífico de las integrinas como es el MnCl_2 (Dransfield et al. 1992), mostró que la reducción en la capacidad de adhesión se debía a una alteración en la capacidad intrínseca de la integrina para ser activada por quimioquinas.

Este último dato se confirmó con los experimentos de adhesión realizados sobre bicapas lipídicas tapizadas con ICAM-1, donde el estímulo con un anticuerpo anti-CD3 no reveló diferencias en la capacidad de adhesión entre los linfocitos T con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida, y los linfocitos T control. Si se observó una menor adhesión a las bicapas tapizadas con ICAM-1 o VCAM-1, en respuesta a CXCL12 o CCL21, en los linfocitos T deficientes en las dos quinasas, respecto a los linfocitos T control.

La conclusión evidente de estos datos es la implicación de las Janus quinasas JAK1 y JAK2 en la activación de las integrinas desde el receptor de quimioquinas.

Además de, en la adhesión ligada a la extravasación celular, la activación de las integrinas resulta clave en otros muchos procesos. Por ejemplo, es importante para una correcta activación del linfocito T tras el reconocimiento por parte del TCR de su antígeno específico (Burbach et al. 2007).

La sinapsis inmunológica es una estructura que se forma durante el proceso en el que un linfocito reconoce a su antígeno específico presentado por una célula presentadora de antígeno (Dustin 2014). Su función es permitir un contacto estable entre las dos células y que asegure la correcta activación del linfocito T (Bromley et al. 2001). La sinapsis inmunológica comprende una región celular muy estructurada, definida por distintas zonas denominadas SMACs, del inglés *Supra Molecular Activation Clusters*, que dan lugar a una estructura conocida como ojo de buey. Se trata de varios anillos concéntricos, el SMAC central (cSMAC), donde se concentran las moléculas de TCR, las moléculas coestimuladoras, y algunas moléculas de señalización; el SMAC periférico (pSMAC), donde se sitúan las moléculas de adhesión y el SMAC distal (dSMAC) formado principalmente por actina polimerizada (Rodríguez-Fernández et al. 2010).

Trabajos previos han localizado al receptor CXCR4 y CCR5 en la zona del pSMAC, donde colabora con el TCR en la activación de la integrina LFA-1 facilitando la adhesión del linfocito a la célula dendrítica (Viola et al. 2010, Kallikourdis et al. 2015).

En nuestro caso, en la sinapsis formada entre células dendríticas derivadas de monocitos obtenidos de médula ósea, maduras con LPS, y cargadas con el péptido de OVA (323-339), y linfocitos T CD4^+ purificados de ratones OT2, el receptor objeto de estudio CXCR4, se posiciona en el pSMAC. El proceso depende de la señalización iniciada por el TCR; los experimentos de TIRFM demuestran la presencia de CXCR4 en el pSMAC cuando hay estimulación con un anticuerpo anti-CD3, reservando al ligando, CXCL12, un papel estimulador de la coalescencia de los receptores. Además, observamos que su función es colaborar en la correcta formación del contacto entre las dos células; así vemos que el bloqueo de la unión de CXCL12 a CXCR4 o la inhibición de la proteína G_i reducen el reclutamiento de la actina polimerizada a la zona de contacto, así como la translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC). Ambos son aspectos críticos para la formación y señalización en la sinapsis (Martin-Cofreces et al. 2008, Reicher et al. 2010, Piragyte et al. 2012, Kumari et al. 2014, Ueda et al. 2015).

Este estudio reveló además, que los linfocitos con la señalización de CXCR4 inhibida o con la expresión del receptor disminuida formaban un número de sinapsis significativamente inferior al que formaban

los linfocitos control.

Como ya observamos en los experimentos de extravasación, donde JAK1 y JAK2 se relacionaban directamente con la activación de las integrinas vía CXCR4 y CCR7, también observamos ahora que el número de conjugados formados entre células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida, es mucho menor comparado con el número de conjugados que forman los linfocitos control; en cambio, este mismo experimento realizado con linfocitos T CD4⁺ tratados con un inhibidor de JAK3 (Tofacitinib), o con linfocitos T CD4⁺ nucleofectados con ARNip para Tyk2, no mostraron diferencias en el número de conjugados formados respecto a los conjugados formados con linfocitos control. Confirmamos así la implicación de JAK1 y JAK2 en la formación de la sinapsis inmunológica y descartamos una implicación definitiva de JAK3 y Tyk2.

La señalización desencadenada tras la unión de CXCL12 a su receptor CXCR4 parece ser imprescindible en la formación de conjugados entre linfocitos T CD4⁺ y células dendríticas. Existe un mutante de CXCR4 que presenta alteraciones en el residuo C-terminal y como consecuencia su internalización está impedida, señalizando de manera constante, y que es el responsable del denominado síndrome de WHIM. El estudio de las sinapsis formadas por linfocitos T purificados de pacientes con esta enfermedad, muestra conjugados en los que la localización de CXCR4 en la sinapsis se encuentra alterada, provocando una menor estabilidad de los mismos (Kallikourdis et al. 2013).

Los experimentos de videomicroscopía realizados para estudiar la estabilidad de los conjugados cuando los linfocitos T CD4⁺ habían sido tratados con los inhibidores AMD3100 y PTx, o nucleofectados con los ARNip para JAK1 y JAK2, mostraron que la mayoría de los contactos que establecían eran de corta duración, siendo su duración media significativamente inferior a la de los contactos que establecían los linfocitos control. Parece evidente que CXCR4 es crítico para conseguir conjugados estables.

Quién aporta la quimioquina durante la formación de la sinapsis resulta una pregunta clave. Sabemos que CXCL12 en los ganglios linfáticos es producido principalmente por las células fibroblásticas reticulares, pero también lo producen las células dendríticas foliculares (Girard et al. 2012). En nuestro sistema, donde las células dendríticas han sido purificadas de médula ósea, hemos analizado la expresión de CXCL12, y concluimos que, si bien las células dendríticas pueden producir algo, lo hacen en cantidades muy pequeñas en comparación con la producida por células estromales de médula ósea. No podemos descartar que una pequeña cantidad de estas células quede contaminando la preparación “in vitro” de células dendríticas que empleamos, y que a ellas se deba el CXCL12 presente. También existe la posibilidad de que las células dendríticas produzcan, aunque en poca cantidad, CXCL12 de manera local en la zona de la sinapsis, como ocurre en la liberación de citoquinas en las sinapsis formadas por linfocitos T citotóxicos (Ritter et al. 2015). Sea cual sea el origen, nuestros estudios por citometría de flujo detectaron la presencia de CXCL12 en la superficie de las células dendríticas, probablemente retenida por los glicosaminoglicanos, pero no sobre los linfocitos T.

Los glicosaminoglicanos son elementos indispensables en la fisiología de las quimioquinas (Proudfoot et al. 2003, Allen et al. 2007), ya que permiten la formación de gradientes quimiotácticos reteniendo quimioquinas en la superficie celular (Monneau et al. 2015). Para analizar cual era la participación de los GAG

en la formación de la sinapsis inmunológica, purificamos células dendríticas de monocitos derivados de médula ósea obtenida de ratones $\text{cxcl12}^{\text{GagTm/GagTm}}$. En estos ratones CXCL12 presenta una mutación que le impide unirse al heparán sulfato (Rueda et al. 2012). Los resultados obtenidos mostraron que los conjugados formados con células dendríticas de estos ratones, y linfocitos T CD4^+ tenían un defecto para translocar el MTOC a la zona de contacto entre las dos células, pero no encontramos diferencias en la duración de los conjugados. Estos resultados indican que aunque los GAG sean elementos muy importantes en la señalización de las quimioquinas “in vivo”, “in vitro”, pueden ser prescindibles, y la quimioquina soluble es capaz de ejercer la misma función. De hecho, la presentación de quimioquinas sobre los GAG no parece imprescindible en otros muchos ensayos de función “in vitro”, como ensayos de quimiotaxis, adhesión, etc, donde las quimioquinas actúan de manera soluble.

La sinapsis inmunológica tiene una estructura altamente organizada, por lo que resultaba de gran interés estudiar si los efectos observados correlacionaban con alteraciones en dicha estructura.

Los experimentos de formación de conjugados entre linfocitos T CD4^+ y microesferas tapizadas con un anticuerpo anti-CD3 y CXCL12 soluble, mostraron que la presencia de CXCL12 es necesaria para la correcta localización de los marcadores del SMAC central, CD3 ζ y PKC θ , así como de los marcadores del SMAC periférico, talina y CXCR4. La talina, es una molécula muy importante en la activación de las integrinas, ya que se une a su cola citoplasmática y aumenta su afinidad por el ligando (Moser et al. 2009). De hecho, los conjugados formados por linfocitos sin la expresión de talina presentan el mismo fenotipo que los observados al bloquear la señalización de CXCR4; son menos estables y de menor duración, confirmando la importancia de la activación de las integrinas en la estabilización de los conjugados (Wernimont et al. 2011). Estos resultados de nuevo relacionan a CXCR4 con la activación de las integrinas, y relacionan las rutas dependientes de Gi y de JAK con dicho efecto.

Nuestros resultados al bloquear la señalización de CXCR4 o al disminuir la expresión de JAK1 y JAK2 son similares a los obtenidos en las sinapsis formadas con linfocitos deficientes en talina, donde se aprecia una alteración en la estructura, ya que los conjugados formados no son capaces de polarizar la actina polimerizada a la zona de contacto entre las dos células (Wernimont et al. 2011), y una menor capacidad de proliferación de los linfocitos. Un efecto muy similar ocurre en los conjugados formados con linfocitos obtenidos de pacientes con el síndrome WHIM, en los que se observa un defecto en la estructura de la sinapsis, concretamente en la localización de CXCR4, y defectos en la activación de los linfocitos T. La polimerización y localización de la actina está relacionada tanto con la correcta situación de los microagregados de moléculas de TCR (Kumari et al. 2014), como también con otras moléculas como CXCR4, que se asocia al citoesqueleto de actina a través de otra molécula, la drebrina (Mikati et al. 2013). De hecho, su ausencia provoca una alteración en la estructura de la sinapsis y un defecto en la producción de IL-2 y por lo tanto en la capacidad proliferativa del linfocito T (Perez-Martinez et al. 2010). La activación del TCR y otros elementos que controlan la dinámica del citoesqueleto de actina son claves en la eficacia de activación de los linfocitos T (Tskvitaria-Fuller et al. 2003).

La estabilidad de los conjugados está directamente relacionada con la capacidad de activación del linfocito T, y con su consiguiente capacidad proliferativa. Nosotros también apreciamos que los conjugados formados entre células dendríticas y linfocitos T CD4^+ tratados con los inhibidores de CXCR4, o con linfocitos con la expresión de JAK1 y JAK2 disminuida, muestran un menor marcaje de fosfotirosina a tiempos cortos, una menor expresión de marcadores de activación como CD69 y CD25 a tiempos más largos, y una

disminución de su capacidad proliferativa de dichos linfocitos.

Las células animales tienen la capacidad de cambiar o adaptar su forma al entorno, de moverse, dividirse o realizar endocitosis y exocitosis... etc. Esta capacidad es posible por la existencia de una maquinaria de proteínas altamente coordinadas, donde la actina es la proteína principal. Ésta es una proteína globular con capacidad para polimerizar formando filamentos con distintos grados de organización (Blanchoin et al. 2014). Durante la migración los linfocitos adquieren un fenotipo polarizado donde se puede distinguir el frente de avance, formado por el lamelipodio, que está sometido a contracciones periódicas debidas a un flujo retrogrado de actina (Giannone et al. 2004), y el urópodo.

La señalización a través de los receptores de quimioquinas induce la polarización de la célula y su migración en un gradiente quimiotáctico, en un proceso en el que participan de manera coordinada la polimerización del citoesqueleto de actina (Samstag et al. 2003) y la red de filamentos de tubulina (Kaverina et al. 2011).

En los dos modelos estudiados en esta Tesis hemos observado que la polimerización de actina es un elemento clave en la señalización a través del receptor de quimioquinas. Las sinapsis inmunológicas formadas con linfocitos T que tienen un defecto en la señalización de CXCR4, o con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida, presentan una menor polarización de actina polimerizada a la zona de contacto. A su vez, los experimentos de migración y extravasación demuestran que la deficiencia de JAK1 y JAK2 también genera una reducción en la capacidad de polimerizar actina, y en la propia polarización de la célula.

La actina conecta con la membrana celular a través de distintas moléculas, como las proteínas ezrina, radixina y moesina (ERM) (Dupre et al. 2015), que se unen a la cola citoplasmática de las proteínas transmembrana, como es el caso de las integrinas y los receptores de quimioquinas (Parameswaran et al. 2013). Además, las Janus quinasas tienen un residuo FERM que podría mimetizar su unión a estas proteínas (Ubel et al. 2013). Los ciclos de defosforilación y fosforilación en las proteínas ERM, inducen cambios conformacionales en las mismas que promueven cambios en la reorganización del citoesqueleto (Parameswaran et al. 2013). El bloqueo de este ciclo cuando se inhibe la señalización inducida por CXCL12, o se reduce la expresión de JAK1 y JAK2, puede explicar los defectos en la polimerización de actina observados en nuestros experimentos.

La señalización desencadenada tras la activación de los receptores de quimioquinas implica la activación de la proteínas G, que va a dar lugar a la activación de diferentes rutas de señalización que incluyen a las MAPK, PI3K, GTPasas y PLC, y que desencadenan diferentes funciones, entre ellas la activación de las integrinas (Kinashi 2005, Thelen et al. 2008). Nuestros resultados indican que JAK1 y JAK2 también participan en la activación de las integrinas desde CXCR4 y CCR7, y este mecanismo es independiente de la señalización iniciada por la proteína Gi

En concreto, el mecanismo molecular que conecta CXCR4 con las integrinas implica la fosforilación de Zap70, que fosforila a Vav-1 activando a RhoA y en consecuencia a la integrina (Garcia-Bernal et al. 2009). En nuestro estudio se demuestra que esta ruta está activa, sin embargo, cuando empleamos inhibidores de CXCR4, como AMD3100 o PTx, vemos que sólo bloqueamos la fosforilación de Zap70, pero la activación de Vav-1 y RhoA sigue produciéndose, aunque en menor grado. Este efecto es debido a que en

esta ruta de activación de las integrinas debe existir un elemento intermediario que activa a Vav-1, y que es independiente de la proteína G. Este papel lo realizan las Janus quinasas, porque en los linfocitos T deficientes en JAK1 y JAK2, CXCL12 no produce la fosforilación de Vav-1, pero RhoA continúa activándose. Estos resultados confirman los datos presentes en la literatura (Montresor et al. 2013, Montresor et al. 2015) y demuestran la relevancia de las Janus quinasas en la función asociada a los receptores de quimioquinas.

El modelo de señalización indicaría que en los linfocitos T vírgenes la activación de los receptores de quimioquinas, CXCR4 y CCR7, por sus ligandos, CXCL12 y CCL21 respectivamente, además de activar a la proteína Gi, también activarían a las Janus quinasas, JAK1 y JAK2. Ambas rutas por mecanismos sinérgicos que incluyen, Zap70 o Vav-1, dependiendo del itinerario elegido, conducen a la activación de RhoA y de las integrinas. La activación de las integrinas es lógicamente clave para la extravasación celular, pero también para conferir estabilidad a la sinapsis inmunológica y conseguir una activación completa del linfocito T (**Fig. 42**).

Inhibidores químicos de las Janus quinasas pueden resultar de gran interés terapéutico no sólo por el bloqueo que generan de las citoquinas inflamatorias, sino también, porque permitirían modular la llegada de células al foco inflamatorio y la propia capacidad de activar linfocitos T por células presentadoras de antígeno.

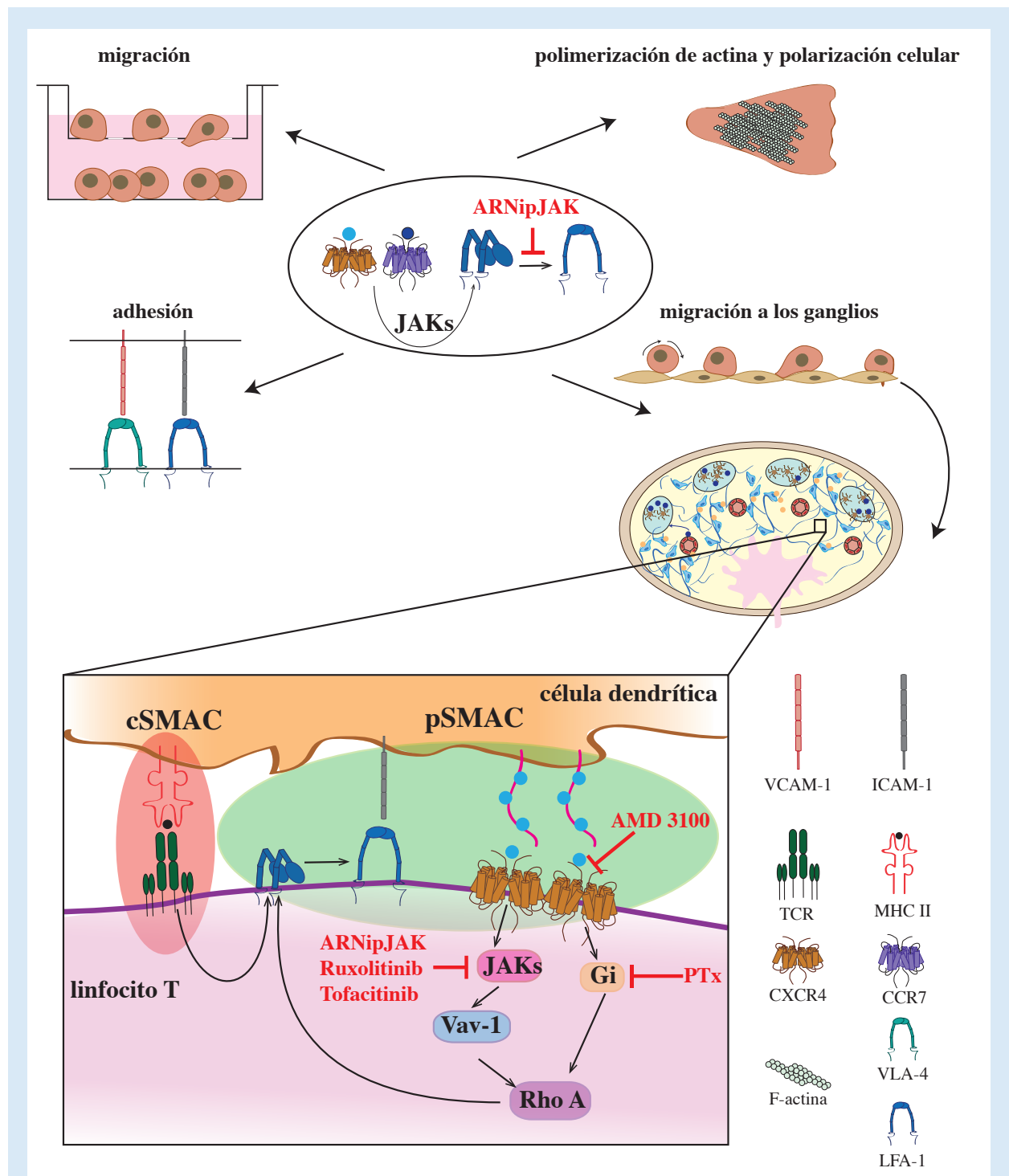


Figura 42. Modelo propuesto. La inhibición o reducción de la expresión de JAK1 y JAK2 de manera simultánea genera defectos en la migración “vitro” e “in vivo”, así como en la capacidad de adhesión de los linfocitos T vírgenes debido a un defecto en la activación de las integrinas desde el receptor de quimioquinas. Esta vía de activación es muy importante en la formación de la sinapsis inmunológica y de hecho, su inhibición, así como un defecto en las quinasas JAK 1 y JAK2 da lugar a una alteración en la capacidad de formación y en la estructura de la sinapsis inmunológica, que se traduce en una alteración de la activación y proliferación del linfocito T.

IX. Conclusiones

1. Las Janus quinasas participan en la señalización por quimioquinas y son claves para que su función sea completa.
2. Las Janus quinasas JAK1 y JAK2 están implicadas en la migración o *homing* de los linfocitos T vírgenes a los ganglios linfáticos, sin embargo, no participan en el movimiento ni en la localización de los mismos dentro del ganglio.
3. JAK1 y JAK2 están implicadas en la ruta de activación iniciada por las quimioquinas que conduce a la activación de las integrinas (señalización *inside-out*). El mecanismo implica la fosforilación de Vav-1, vía Zap70, y la activación de RhoA, y se desarrolla en paralelo a la activación de la proteína Gi que también conduce a la activación de RhoA.
4. Las Janus quinasas también conectan el receptor de quimioquinas con la polimerización de actina en una ruta que implica a las proteínas Ezrina, Radixina y Mosina (ERM).
5. La señalización a través de las Janus quinasas está implicada en la polarización celular promovida por las quimioquinas.
6. La señalización desencadenada por el TCR promueve la concentración de CXCR4 en el pSMAC.
7. La presencia de CXCL12 produce la coalescencia de su receptor CXCR4 en el pSMAC.

8. En la sinapsis inmunológica, la señalización activada a través de CXCR4, contribuye a incrementar la estabilidad de la estructura, su durabilidad temporal y en consecuencia la activación del linfocito T. El mecanismo implica de nuevo a las Janus quinasas JAK1 y JAK2 que conectan CXCR4 con la activación de las integrinas.

Bibliografía

A

Alarcon, B., D. Mestre and N. Martinez-Martin (2011). "The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering?" *Immunology* **133**(4): 420-425.

Alcami, A. (2003). "Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors." *Nat Rev Immunol* **3**(1): 36-50.

Allen, S. J., S. E. Crown and T. M. Handel (2007). "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." *Annu Rev Immunol* **25**: 787-820.

Allman, D. and S. Pillai (2008). "Peripheral B cell subsets." *Curr Opin Immunol* **20**(2): 149-157.

Alon, R. and M. L. Dustin (2007). "Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells." *Immunity* **26**(1): 17-27.

Alvarez, D., E. H. Vollmann and U. H. von Andrian (2008). "Mechanisms and consequences of dendritic cell migration." *Immunity* **29**(3): 325-342.

Ambriz-Pena, X., E. A. Garcia-Zepeda, I. Meza and G. Soldevila (2014). "Jak3 enables chemokine-dependent actin cytoskeleton reorganization by regulating cofilin and Rac/Rhoa GTPases activation." *PLoS One* **9**(2): e88014.

Ara, T., K. Tokoyoda, T. Sugiyama, T. Egawa, K. Kawabata and T. Nagasawa (2003). "Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny." *Immunity* **19**(2): 257-267.

Arnon, T. I. and J. G. Cyster (2014). "Blood, sphingosine-1-phosphate and lymphocyte migration dynamics in the spleen." *Curr Top Microbiol Immunol* **378**: 107-128.

Arora, T., B. Liu, H. He, J. Kim, T. L. Murphy, K. M. Murphy, R. L. Modlin and K. Shuai (2003). "PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4." *J Biol Chem* **278**(24): 21327-21330.

B

Babon, J. J., I. S. Lucet, J. M. Murphy, N. A. Nicola and L. N. Varghese (2014). "The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation." *Biochem J* **462**(1): 1-13.

Bachelierie, F., A. Ben-Baruch, A. M. Burkhardt, C. Combadiere, J. M. Farber, G. J. Graham, R. Horuk, A. H. Sparre-Ulrich, M. Locati, A. D. Luster, A. Mantovani, K. Matsushima, P. M. Murphy, R. Nibbs, H. Nomiyama, C. A. Power, A. E. Proudfoot, M. M. Rosenkilde, A. Rot, S. Sozzani, M. Thelen, O. Yoshie and A. Zlotnik (2014a). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors." *Pharmacol Rev* **66**(1): 1-79.

Bachelierie, F., G. J. Graham, M. Locati, A. Mantovani, P. M. Murphy, R. Nibbs, A. Rot, S. Sozzani and M. Thelen (2014b). "New nomenclature for atypical chemokine receptors." *Nat Immunol* **15**(3): 207-208.

Baekkevold, E. S., T. Yamanaka, R. T. Palframan, H. S. Carlsen, F. P. Reinholt, U. H. von Andrian, P. Brandtzaeg and G. Haraldsen (2001). "The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment." *J Exp Med* **193**(9): 1105-1112.

Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." *Nature* **392**(6676): 565-568.

Bai, Z., H. Hayasaka, M. Kobayashi, W. Li, Z. Guo, M. H. Jang, A. Kondo, B. I. Choi, Y. Iwakura and M. Miyasaka (2009). "CXC chemokine ligand 12 promotes CCR7-dependent naive T cell trafficking to lymph nodes and Peyer's patches." *J Immunol* **182**(3): 1287-1295.

Bajenoff, M., J. G. Egen, L. Y. Koo, J. P. Laugier, F. Brau, N. Glaichenhaus and R. N. Germain (2006). "Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes." *Immunity* **25**(6): 989-1001.

Balabanian, K., E. Brodin, V. Biais, L. Bouchet-Delbos, E. Lainey, O. Fenneteau, D. Bonnet, L. Fiette, D. Emilie and F. Bachelierie (2012). "Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice." *Blood* **119**(24): 5722-5730.

Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." *Nat Rev Cancer* **4**(7): 540-550.

Bao, X., E. A. Moseman, H. Saito, B. Petryniak, A. Thiriot, S. Hatakeyama, Y. Ito, H. Kawashima, Y. Yamaguchi, J. B. Lowe, U. H. von Andrian and M. Fukuda (2010). "Endothelial heparan sulfate controls chemokine presentation in recruitment of lymphocytes and dendritic cells to lymph nodes." *Immunity* **33**(5): 817-829.

Barroso, R., L. Martinez Munoz, S. Barrondo, B. Vega, B. L. Holgado, P. Lucas, A. Baillo, J. Sallés, J. M. Rodríguez-Frade and M. Mellado (2012). "EBI2 regulates CXCL13-mediated responses by heterodimerization with CXCR5." *FASEB J* **26**(12): 4841-4854.

Berlin-Rufenach, C., F. Otto, M. Mathies, J. Westermann, M. J. Owen, A. Hamann and N. Hogg (1999). "Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice." *J Exp Med* **189**(9): 1467-1478.

Billadeau, D. D., J. C. Nolz and T. S. Gomez (2007). "Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton." *Nat Rev Immunol* **7**(2): 131-143.

Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes and J. Plastino (2014). "Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility." *Physiol Rev* **94**(1): 235-263.

Bolomini-Vittori, M., A. Montresor, C. Giagulli, D. Staunton, B. Rossi, M. Martinello, G. Constantin and C. Laudanna (2009). "Regulation of conformer-specific activation of the integrin LFA-1 by a chemokine-triggered Rho signaling module." *Nat Immunol* **10**(2): 185-194.

Boomer, J. S. and J. M. Green (2010). "An enigmatic tail of CD28 signaling." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(8): a002436.

Bretscher, A., K. Edwards and R. G. Fehon (2002). "ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(8): 586-599.

Bromley, S. K., W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin (2001). "The immunological synapse." *Annu Rev Immunol* **19**: 375-396.

Bromley, S. K. and M. L. Dustin (2002). "Stimulation of naive T-cell adhesion and immunological synapse formation by chemokine-dependent and -independent mechanisms." *Immunology* **106**(3): 289-298.

Brown, F. D. and S. J. Turley (2015). "Fibroblastic reticular cells: organization and regulation of the T lymphocyte life cycle." *J Immunol* **194**(4): 1389-1394.

Brown, M. J., R. Nijhara, J. A. Hallam, M. Gignac, K. M. Yamada, S. L. Erlandsen, J. Delon, M. Kruhlak and S. Shaw (2003). "Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization." *Blood* **102**(12): 3890-3899.

Broxmeyer, H. E., S. Cooper, G. Hangoc and C. H. Kim (2005). "Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 selectively counteracts inhibitory effects of myelosuppressive chemokines on hematopoietic progenitor cell proliferation in vitro." *Stem Cells Dev* **14**(2): 199-203.

Burbach, B. J., R. B. Medeiros, K. L. Mueller and Y. Shimizu (2007). "T-cell receptor signaling to integrins." *Immunol Rev* **218**: 65-81.

Burkhardt, J. K., E. Carrizosa and M. H. Shaffer (2008). "The actin cytoskeleton in T cell activation." *Annu Rev Immunol* **26**: 233-259.

Busillo, J. M. and J. L. Benovic (2007). "Regulation of CXCR4 signaling." *Biochim Biophys Acta* **1768**(4): 952-963.

Butcher, E. C. (1991). "Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity." *Cell* **67**(6): 1033-1036.

C

Campi, G., R. Varma and M. L. Dustin (2005). "Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling." *J Exp Med* **202**(8): 1031-1036.

Cavanagh, L. L. and U. H. Von Andrian (2002). "Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells." *Immunol Cell Biol* **80**(5): 448-462.

Chang, J. E. and S. J. Turley (2015). "Stromal infrastructure of the lymph node and coordination of immunity." *Trends Immunol* **36**(1): 30-39.

Changelian, P. S., M. E. Flanagan, D. J. Ball, C. R. Kent, K. S. Magnuson, W. H. Martin, B. J. Rizzuti, P. S. Sawyer, B. D. Perry, W. H. Brissette, S. P. McCurdy, E. M. Kudlacz, M. J. Conklyn, E. A. Elliott, E. R. Koslov, M. B. Fisher, T. J. Strelevitz, K. Yoon, D. A. Whipple, J. Sun, M. J. Munchhof, J. L. Doty, J. M. Casavant, T. A. Blumenkopf, M. Hines, M. F. Brown, B. M. Lillie, C. Subramanyam, C. Shang-Poa, A. J. Milici, G. E. Beckius, J. D. Moyer, C. Su, T. G. Woodworth, A. S. Gaweco, C. R. Beals, B. H. Littman, D. A. Fisher, J. F. Smith, P. Zagouras, H. A. Magna, M. J. Saltarelli, K. S. Johnson, L. F. Nelms, S. G. Des Etages, L. S. Hayes, T. T. Kawabata, D. Finco-Kent, D. L. Baker, M. Larson, M. S. Si, R. Paniagua, J. Higgins, B. Holm, B. Reitz, Y. J. Zhou, R. E. Morris, J. J. O'Shea and D. C. Borie (2003). "Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor." *Science* **302**(5646): 875-878.

Charo, I. F. and M. B. Taubman (2004). "Chemokines in the pathogenesis of vascular disease." Circ Res **95**(9): 858-866.

Chatterjee, S., B. Behnam Azad and S. Nimmagadda (2014). "The intricate role of CXCR4 in cancer." Adv Cancer Res **124**: 31-82.

Chen, M., A. Cheng, F. Candotti, Y. J. Zhou, A. Hymel, A. Fasth, L. D. Notarangelo and J. J. O'Shea (2000). "Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains." Mol Cell Biol **20**(3): 947-956.

Choi, W. T., S. Duggineni, Y. Xu, Z. Huang and J. An (2012). "Drug discovery research targeting the CXC chemokine receptor 4 (CXCR4)." J Med Chem **55**(3): 977-994.

Chow, M. T. and A. D. Luster (2014). "Chemokines in cancer." Cancer Immunol Res **2**(12): 1125-1131.

Comerford, I., Y. Harata-Lee, M. D. Bunting, C. Gregor, E. E. Kara and S. R. McColl (2013). "A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system." Cytokine Growth Factor Rev **24**(3): 269-283.

Contento, R. L., B. Molon, C. Boullaran, T. Pozzan, S. Manes, S. Marullo and A. Viola (2008). "CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10101-10106.

Cotton, M. and A. Claing (2009). "G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration." Cell Signal **21**(7): 1045-1053.

Cyster, J. G., K. M. Ansel, K. Reif, E. H. Ekland, P. L. Hyman, H. L. Tang, S. A. Luther and V. N. Ngo (2000). "Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles." Immunol Rev **176**: 181-193.

Cyster, J. G. and S. R. Schwab (2012). "Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs." Annu Rev Immunol **30**: 69-94.

D

David, M., H. E. Chen, S. Goelz, A. C. Lerner and B. G. Neel (1995). "Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1." Mol Cell Biol **15**(12): 7050-7058.

de la Fuente, H., D. Cibrian and F. Sanchez-Madrid (2012). "Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the immune response." *FEBS Lett* **586**(18): 2897-2905.

Debnath, B., S. Xu, F. Grande, A. Garofalo and N. Neamati (2013). "Small molecule inhibitors of CXCR4." *Theranostics* **3**(1): 47-75.

Delon, J., S. Stoll and R. N. Germain (2002). "Imaging of T-cell interactions with antigen presenting cells in culture and in intact lymphoid tissue." *Immunol Rev* **189**: 51-63.

Dixit, N. and S. I. Simon (2012). "Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest." *Front Immunol* **3**: 188.

Dransfield, I., C. Cabanas, A. Craig and N. Hogg (1992). "Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1." *J Cell Biol* **116**(1): 219-226.

Dupre, L., R. Houmadi, C. Tang and J. Rey-Barroso (2015). "T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors." *Front Immunol* **6**: 586.

Dustin, M. L. (2007). "Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses." *Curr Opin Cell Biol* **19**(5): 529-533.

Dustin, M. L. (2008a). "Hunter to gatherer and back: immunological synapses and kinapses as variations on the theme of amoeboid locomotion." *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 577-596.

Dustin, M. L. (2008b). "T-cell activation through immunological synapses and kinapses." *Immunol Rev* **221**: 77-89.

Dustin, M. L. (2009). "The cellular context of T cell signaling." *Immunity* **30**(4): 482-492.

Dustin, M. L. (2014). "The immunological synapse." *Cancer Immunol Res* **2**(11): 1023-1033.

Dustin, M. L., M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen and A. S. Shaw (1998). "A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts." *Cell* **94**(5): 667-677.

F

Filippi, M. D. (2016). "Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route." *Adv Immunol* **129**: 25-53.

Fletcher, A. L., S. E. Acton and K. Knoblich (2015). "Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease." Nat Rev Immunol **15**(6): 350-361.

Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf and M. Lipp (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." Cell **99**(1): 23-33.

Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf and M. Lipp (2016). "Pillars Article: CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. Cell. 1999. 99: 23-33." J Immunol **196**(1): 5-15.

Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin and H. B. Schioth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-1272.

Freiberg, B. A., H. Kupfer, W. Maslanik, J. Delli, J. Kappler, D. M. Zaller and A. Kupfer (2002). "Staging and resetting T cell activation in SMACs." Nat Immunol **3**(10): 911-917.

Fricker, S. P. (2013). "Physiology and pharmacology of plerixafor." Transfus Med Hemother **40**(4): 237-245.

Friedman, R. S., J. Jacobelli and M. F. Krummel (2006). "Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation." Nat Immunol **7**(10): 1101-1108.

Fruehauf, S. (2013). "Current clinical indications for plerixafor." Transfus Med Hemother **40**(4): 246-250.

G

Ganghammer, S., E. Hutterer, E. Hinterseer, G. Brachtel, D. Asslaber, P. W. Krenn, T. Girbl, P. Berghammer, R. Geisberger, A. Egle, A. Zucchetto, A. Kruschinski, V. Gattei, A. Chigayev, R. Greil and T. N. Hartmann (2015). "CXCL12-induced VLA-4 activation is impaired in trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: a role for CCL21." Oncotarget **6**(14): 12048-12060.

Garcia-Bernal, D., M. Parro-Cabanas, A. Dios-Esponera, R. Samaniego, P. d. I. O. D. Hernan and J. Teixeira (2009). "Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion." Immunity **31**(6): 953-964.

Garcia-Zepeda, E. A., I. Licona-Limon, M. F. Jimenez-Solomon and G. Soldevila (2007). "Janus kinase 3-deficient T lymphocytes have an intrinsic defect in CCR7-mediated homing to peripheral lymphoid organs." Immunology **122**(2): 247-260.

Gautreau, A., D. Louvard and M. Arpin (2002). "ERM proteins and NF2 tumor suppressor: the Yin and Yang of cortical actin organization and cell growth signaling." *Curr Opin Cell Biol* **14**(1): 104-109.

Giannone, G., B. J. Dubin-Thaler, H. G. Dobereiner, N. Kieffer, A. R. Bresnick and M. P. Sheetz (2004). "Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves." *Cell* **116**(3): 431-443.

Girard, J. P., C. Moussion and R. Forster (2012). "HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes." *Nat Rev Immunol* **12**(11): 762-773.

Gonzalez, N., M. Bermejo, E. Calonge, C. Jolly, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Pablos, Q. J. Sattentau and J. Alcamí (2010). "SDF-1/CXCL12 production by mature dendritic cells inhibits the propagation of X4-tropic HIV-1 isolates at the dendritic cell-T-cell infectious synapse." *J Virol* **84**(9): 4341-4351.

Graham, G. J., M. Locati, A. Mantovani, A. Rot and M. Thelen (2012). "The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors." *Immunol Lett* **145**(1-2): 30-38.

Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin (2015). "Pillars article: The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. Science. 1999. 285: 221-227." *J Immunol* **194**(9): 4066-4072.

Griffith, J. W., C. L. Sokol and A. D. Luster (2014). "Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity." *Annu Rev Immunol* **32**: 659-702.

Guo, F., Y. Wang, J. Liu, S. C. Mok, F. Xue and W. Zhang (2015). "CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks." *Oncogene*.

H

Hamann, A., D. Jablonski-Westrich, A. Duijvestijn, E. C. Butcher, H. Baisch, R. Harder and H. G. Thiele (1988). "Evidence for an accessory role of LFA-1 in lymphocyte-high endothelium interaction during homing." *J Immunol* **140**(3): 693-699.

Hashimoto-Tane, A., T. Yokosuka, C. Ishihara, M. Sakuma, W. Kobayashi and T. Saito (2010). "T-cell receptor microclusters critical for T-cell activation are formed independently of lipid raft clustering." *Mol Cell Biol* **30**(14): 3421-3429.

Hashimoto-Tane, A., T. Yokosuka, K. Sakata-Sogawa, M. Sakuma, C. Ishihara, M. Tokunaga and T. Saito (2011). "Dynein-driven transport of T cell receptor microclusters regulates immune synapse formation and T cell activation." *Immunity* **34**(6): 919-931.

Hauser, M. A. and D. F. Legler (2016a). "Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes." *J Leukoc Biol.*

Hauser, M. A., K. Schaeuble, I. Kindinger, D. Impellizzieri, W. A. Krueger, C. R. Hauck, O. Boyman and D. F. Legler (2016b). "Inflammation-Induced CCR7 Oligomers Form Scaffolds to Integrate Distinct Signaling Pathways for Efficient Cell Migration." *Immunity* **44**(1): 59-72.

Hernandez, P. A., R. J. Gorlin, J. N. Lukens, S. Taniuchi, J. Bohinjec, F. Francois, M. E. Klotman and G. A. Diaz (2003). "Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease." *Nat Genet* **34**(1): 70-74.

Hogg, N., I. Patzak and F. Willenbrock (2011). "The insider's guide to leukocyte integrin signaling and function." *Nat Rev Immunol* **11**(6): 416-426.

J

Jaqaman, K., D. Loerke, M. Mettlen, H. Kuwata, S. Grinstein, S. L. Schmid and G. Danuser (2008). "Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences." *Nat Methods* **5**(8): 695-702.

K

Kallikourdis, M., A. E. Trovato, F. Anselmi, A. Sarukhan, G. Roselli, L. Tassone, R. Badolato and A. Viola (2013). "The CXCR4 mutations in WHIM syndrome impair the stability of the T-cell immunologic synapse." *Blood* **122**(5): 666-673.

Kallikourdis, M., A. Viola and F. Benvenuti (2015). "Human Immunodeficiencies Related to Defective APC/T Cell Interaction." *Front Immunol* **6**: 433.

Katakai, T., H. Suto, M. Sugai, H. Gonda, A. Togawa, S. Suematsu, Y. Ebisuno, K. Katagiri, T. Kinashi and A. Shimizu (2008). "Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs." *J Immunol* **181**(9): 6189-6200.

Kaverina, I. and A. Straube (2011). "Regulation of cell migration by dynamic microtubules." *Semin Cell Dev Biol* **22**(9): 968-974.

Kawai, T., U. Choi, L. Cardwell, S. S. DeRavin, N. Naumann, N. L. Whiting-Theobald, G. F. Linton, J. Moon, P. M. Murphy and H. L. Malech (2007). "WHIM syndrome myelokathexis reproduced in the NOD/SCID mouse xenotransplant model engrafted with healthy human stem cells transduced with C-terminus-truncated CXCR4." *Blood* **109**(1): 78-84.

Kawamura, M., D. W. McVicar, J. A. Johnston, T. B. Blake, Y. Q. Chen, B. K. Lal, A. R. Lloyd, D. J. Kelvin, J. E. Staples, J. R. Ortaldo and et al. (1994). "Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(14): 6374-6378.

Khorramdelazad, H., V. Bagheri, G. Hassanshahi, M. Zeinali and A. Vakilian (2016). "New insights into the role of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12) in the pathophysiology of multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **290**: 70-75.

Kinashi, T. (2005). "Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes." *Nat Rev Immunol* **5**(7): 546-559.

Kollet, O., S. Shvitz, Y. Q. Chen, J. Suriawinata, S. N. Thung, M. D. Dabeva, J. Kahn, A. Spiegel, A. Dar, S. Samira, P. Goichberg, A. Kalinkovich, F. Arenzana-Seisdedos, A. Nagler, I. Hardan, M. Revel, D. A. Shafritz and T. Lapidot (2003). "HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver." *J Clin Invest* **112**(2): 160-169.

Kong, K. F., T. Yokosuka, A. J. Canonigo-Balancio, N. Isakov, T. Saito and A. Altman (2011). "A motif in the V3 domain of the kinase PKC- θ determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28." *Nat Immunol* **12**(11): 1105-1112.

Krogsgaard, M. (2014). "Imprinting of the mature T cell response by self." *Trends Immunol* **35**(4): 141-143.

Ksionda, O., A. Saveliev, R. Kochl, J. Rapley, M. Faroudi, J. E. Smith-Garvin, C. Wulfig, K. Rittinger, T. Carter and V. L. Tybulewicz (2012). "Mechanism and function of Vav1 localisation in TCR signalling." *J Cell Sci* **125**(Pt 22): 5302-5314.

Kufareva, I., C. L. Salanga and T. M. Handel (2015). "Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies." *Immunol Cell Biol* **93**(4): 372-383.

Kumari, S., S. Curado, V. Mayya and M. L. Dustin (2014). "T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling." *Biochim Biophys Acta* **1838**(2): 546-556.

L

Lee, J. H., T. Katakai, T. Hara, H. Gonda, M. Sugai and A. Shimizu (2004). "Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation." *J Cell Biol* **167**(2): 327-337.

Lefort, C. T., J. Rossaint, M. Moser, B. G. Petrich, A. Zarbock, S. J. Monkley, D. R. Critchley, M. H. Ginsberg, R. Fassler and K. Ley (2012). "Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation." *Blood* **119**(18): 4275-4282.

Levoye, A., K. Balabanian, F. Baleux, F. Bachelierie and B. Lagane (2009). "CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling." *Blood* **113**(24): 6085-6093.

Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." *Nat Rev Immunol* **7**(9): 678-689.

Li, M. and R. M. Ransohoff (2008). "Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology." *Prog Neurobiol* **84**(2): 116-131.

Lillemeier, B. F., M. A. Mortelmaier, M. B. Forstner, J. B. Huppa, J. T. Groves and M. M. Davis (2010). "TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation." *Nat Immunol* **11**(1): 90-96.

Link, A., T. K. Vogt, S. Favre, M. R. Britschgi, H. Acha-Orbea, B. Hinz, J. G. Cyster and S. A. Luther (2007). "Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells." *Nat Immunol* **8**(11): 1255-1265.

Love, P. E. and A. Bhandoola (2011). "Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration." *Nat Rev Immunol* **11**(7): 469-477.

Lusso, P. (2006). "HIV and the chemokine system: 10 years later." *EMBO J* **25**(3): 447-456.

M

Marrero, M. B., B. Schieffer, W. G. Paxton, L. Heerdt, B. C. Berk, P. Delafontaine and K. E. Bernstein (1995). "Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor." *Nature* **375**(6528): 247-250.

Martin-Cofreces, N. B., J. Robles-Valero, J. R. Cabrero, M. Mittelbrunn, M. Gordon-Alonso, C. H. Sung, B. Alarcon, J. Vazquez and F. Sanchez-Madrid (2008). "MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling." *J Cell Biol* **182**(5): 951-962.

Martinez Munoz, L., P. Lucas, G. Navarro, A. I. Checa, R. Franco, A. C. Martinez, J. M. Rodriguez-Frade and M. Mellado (2009). "Dynamic regulation of CXCR1 and CXCR2 homo- and heterodimers." J Immunol **183**(11): 7337-7346.

Masopust, D. and J. M. Schenkel (2013). "The integration of T cell migration, differentiation and function." Nat Rev Immunol **13**(5): 309-320.

Mellado, M., A. C. Martinez and J. M. Rodriguez-Frade (2002). "Analysis of G-protein-coupled receptor dimerization following chemokine signaling." Methods **27**(4): 349-357.

Mellado, M., A. C. Martinez and J. M. Rodriguez-Frade (2008). "Drug testing in cellular chemotaxis assays." Curr Protoc Pharmacol **Chapter 12**: Unit 12 11.

Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, A. Aragay, G. del Real, A. M. Martin, A. J. Vila-Coro, A. Serrano, F. Mayor, Jr. and A. C. Martinez (1998). "The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor." J Immunol **161**(2): 805-813.

Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, S. Manes and A. C. Martinez (2001a). "Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation." Annu Rev Immunol **19**: 397-421.

Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, A. J. Vila-Coro, S. Fernandez, A. Martin de Ana, D. R. Jones, J. L. Toran and A. C. Martinez (2001b). "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." EMBO J **20**(10): 2497-2507.

Mikati, M. A., E. E. Grintsevich and E. Reisler (2013). "Drebrin-induced stabilization of actin filaments." J Biol Chem **288**(27): 19926-19938.

Miller, M. J., A. S. Hejazi, S. H. Wei, M. D. Cahalan and I. Parker (2004a). "T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(4): 998-1003.

Miller, M. J., O. Safrina, I. Parker and M. D. Cahalan (2004b). "Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes." J Exp Med **200**(7): 847-856.

Mionnet, C., S. L. Sanos, I. Mondor, A. Jorquera, J. P. Laugier, R. N. Germain and M. Bajenoff (2011). "High endothelial venules as traffic control points maintaining lymphocyte population homeostasis in lymph nodes." Blood **118**(23): 6115-6122.

Mitoma, J., X. Bao, B. Petryanik, P. Schaerli, J. M. Gauguet, S. Y. Yu, H. Kawashima, H. Saito, K. Ohtsubo, J. D. Marth, K. H. Khoo, U. H. von Andrian, J. B. Lowe and M. Fukuda (2007). "Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment." Nat Immunol **8**(4): 409-418.

Mittelbrunn, M., G. Martinez del Hoyo, M. Lopez-Bravo, N. B. Martin-Cofreces, A. Scholer, S. Hugues, L. Fetler, S. Amigorena, C. Ardavin and F. Sanchez-Madrid (2009). "Imaging of plasma-cytoid dendritic cell interactions with T cells." Blood **113**(1): 75-84.

Miyasaka, M. and T. Tanaka (2004). "Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas." Nat Rev Immunol **4**(5): 360-370.

Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky and A. Kupfer (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." Nature **395**(6697): 82-86.

Monneau, Y., F. Arenzana-Seisdedos and H. Lortat-Jacob (2015). "The sweet spot: how GAGs help chemokines guide migrating cells." J Leukoc Biol.

Montresor, A., M. Bolomini-Vittori, L. Toffali, B. Rossi, G. Constantin and C. Laudanna (2013). "JAK tyrosine kinases promote hierarchical activation of Rho and Rap modules of integrin activation." J Cell Biol **203**(6): 1003-1019.

Montresor, A., L. Toffali, M. Mirenda, A. Rigo, F. Vinante and C. Laudanna (2015). "JAK2 tyrosine kinase mediates integrin activation induced by CXCL12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Oncotarget **6**(33): 34245-34257.

Mori, S., H. Nakano, K. Aritomi, C. R. Wang, M. D. Gunn and T. Kakiuchi (2001). "Mice lacking expression of the chemokines CCL21-ser and CCL19 (plt mice) demonstrate delayed but enhanced T cell immune responses." J Exp Med **193**(2): 207-218.

Moriguchi, M., B. D. Hissong, M. Gadina, K. Yamaoka, H. L. Tiffany, P. M. Murphy, F. Candotti and J. J. O'Shea (2005). "CXCL12 signaling is independent of Jak2 and Jak3." J Biol Chem **280**(17): 17408-17414.

Moser, M., K. R. Legate, R. Zent and R. Fassler (2009). "The tail of integrins, talin, and kindlins." Science **324**(5929): 895-899.

Mueller, K. L., M. A. Daniels, A. Felthouser, C. Kao, S. C. Jameson and Y. Shimizu (2004). "Cutting edge: LFA-1 integrin-dependent T cell adhesion is regulated by both ag specificity and sensitivity." J Immunol **173**(4): 2222-2226.

Mueller, S. N. and R. N. Germain (2009). "Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system." Nat Rev Immunol **9**(9): 618-629.

Muller, W. A. (2011). "Mechanisms of leukocyte transendothelial migration." Annu Rev Pathol **6**: 323-344.

Munoz, L. M., B. L. Holgado, A. C. Martinez, J. M. Rodriguez-Frade and M. Mellado (2012). "Chemokine receptor oligomerization: a further step toward chemokine function." Immunol Lett **145**(1-2): 23-29.

Munoz, M. A., M. Biro and W. Weninger (2014). "T cell migration in intact lymph nodes in vivo." Curr Opin Cell Biol **30**: 17-24.

Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim and C. A. Power (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacol Rev **52**(1): 145-176.

Murray, P. J. (2007). "The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration." J Immunol **178**(5): 2623-2629.

N

Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani and T. Kishimoto (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature **382**(6592): 635-638.

Neel, N. F., E. Schutyser, J. Sai, G. H. Fan and A. Richmond (2005). "Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking." Cytokine Growth Factor Rev **16**(6): 637-658.

Neubauer, H., A. Cumano, M. Muller, H. Wu, U. Huffstadt and K. Pfeffer (1998). "Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis." Cell **93**(3): 397-409.

Nibbs, G. J. G. a. R. J. (2007). "Chemokine Receptors: A Structural Overview." The Chemokine Receptors: 31-54.

Nibbs, R. J. and G. J. Graham (2013). "Immune regulation by atypical chemokine receptors." Nat Rev Immunol **13**(11): 815-829.

Nicolas, C. S., S. Peineau, M. Amici, Z. Csaba, A. Fafouri, C. Javalet, V. J. Collett, L. Hildebrandt, G. Seaton, S. L. Choi, S. E. Sim, C. Bradley, K. Lee, M. Zhuo, B. K. Kaang, P. Gressens, P. Dour-

naud, S. M. Fitzjohn, Z. A. Bortolotto, K. Cho and G. L. Collingridge (2012). "The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity." Neuron **73**(2): 374-390.

Nolz, J. C., M. E. Fernandez-Zapico and D. D. Billadeau (2007). "TCR/CD28-stimulated actin dynamics are required for NFAT1-mediated transcription of c-rel leading to CD28 response element activation." J Immunol **179**(2): 1104-1112.

Norcross, M. A. (1984). "A synaptic basis for T-lymphocyte activation." Ann Immunol (Paris) **135D**(2): 113-134.

Nourshargh, S. and R. Alon (2014). "Leukocyte migration into inflamed tissues." Immunity **41**(5): 694-707.

O

O'Sullivan, L. A., C. Liongue, R. S. Lewis, S. E. Stephenson and A. C. Ward (2007). "Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease." Mol Immunol **44**(10): 2497-2506.

P

Parameswaran, N. and N. Gupta (2013). "Re-defining ERM function in lymphocyte activation and migration." Immunol Rev **256**(1): 63-79.

Park, E. J., A. Peixoto, Y. Imai, A. Goodarzi, G. Cheng, C. V. Carman, U. H. von Andrian and M. Shimaoka (2010). "Distinct roles for LFA-1 affinity regulation during T-cell adhesion, diapedesis, and interstitial migration in lymph nodes." Blood **115**(8): 1572-1581.

Park, E. S., H. Kim, J. M. Suh, S. J. Park, S. H. You, H. K. Chung, K. W. Lee, O. Y. Kwon, B. Y. Cho, Y. K. Kim, H. K. Ro, J. Chung and M. Shong (2000). "Involvement of JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) in the thyrotropin signaling pathway." Mol Endocrinol **14**(5): 662-670.

Paul, W. E. and R. A. Seder (1994). "Lymphocyte responses and cytokines." Cell **76**(2): 241-251.

Pawig, L., C. Klasen, C. Weber, J. Bernhagen and H. Noels (2015). "Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives." Front Immunol **6**: 429.

Perez-Martinez, M., M. Gordon-Alonso, J. R. Cabrero, M. Barrero-Villar, M. Rey, M. Mittelbrunn, A. Lamana, G. Morlino, C. Calabia, H. Yamazaki, T. Shirao, J. Vazquez, R. Gonzalez-Amaro, E. Veiga and F. Sanchez-Madrid (2010). "F-actin-binding protein drebrin regulates CXCR4 recruitment to the immune synapse." *J Cell Sci* **123**(Pt 7): 1160-1170.

Piragyte, I. and C. D. Jun (2012). "Actin engine in immunological synapse." *Immune Netw* **12**(3): 71-83.

Poltorak, M. P. and B. U. Schraml (2015). "Fate mapping of dendritic cells." *Front Immunol* **6**: 199.

Ponomaryov, T., A. Peled, I. Petit, R. S. Taichman, L. Habler, J. Sandbank, F. Arenzana-Seisdedos, A. Magerus, A. Caruz, N. Fujii, A. Nagler, M. Lahav, M. Szyper-Kravitz, D. Zipori and T. Lapidot (2000). "Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function." *J Clin Invest* **106**(11): 1331-1339.

Proudfoot, A. E., T. M. Handel, Z. Johnson, E. K. Lau, P. LiWang, I. Clark-Lewis, F. Borlat, T. N. Wells and M. H. Kosco-Vilbois (2003). "Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1885-1890.

R

Rane, S. G. and E. P. Reddy (2000). "Janus kinases: components of multiple signaling pathways." *Oncogene* **19**(49): 5662-5679.

Reicher, B. and M. Barda-Saad (2010). "Multiple pathways leading from the T-cell antigen receptor to the actin cytoskeleton network." *FEBS Lett* **584**(24): 4858-4864.

Reif, K., E. H. Ekland, L. Ohl, H. Nakano, M. Lipp, R. Forster and J. G. Cyster (2002). "Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position." *Nature* **416**(6876): 94-99.

Ribeiro, S. and R. Horuk (2005). "The clinical potential of chemokine receptor antagonists." *Pharmacol Ther* **107**(1): 44-58.

Ritter, A. T., Y. Asano, J. C. Stinchcombe, N. M. Dieckmann, B. C. Chen, C. Gawden-Bone, S. van Engelenburg, W. Legant, L. Gao, M. W. Davidson, E. Betzig, J. Lippincott-Schwartz and G. M. Griffiths (2015). "Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse." *Immunity* **42**(5): 864-876.

Rodig, S. J., M. A. Meraz, J. M. White, P. A. Lampe, J. K. Riley, C. D. Arthur, K. L. King, K. C. Sheehan, L. Yin, D. Pennica, E. M. Johnson, Jr. and R. D. Schreiber (1998). "Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses." Cell **93**(3): 373-383.

Rodriguez-Fernandez, J. L., L. Riol-Blanco and C. Delgado-Martin (2010). "What is an immunological synapse?" Microbes Infect **12**(6): 438-445.

Rodriguez-Frade, J. M., L. M. Munoz, B. L. Holgado and M. Mellado (2009). "Chemokine receptor dimerization and chemotaxis." Methods Mol Biol **571**: 179-198.

Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, A. M. de Ana, J. P. Albar, A. C. Martinez and M. Mellado (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3628-3633.

Rueda, P., A. Richart, A. Recalde, P. Gasse, J. Vilar, C. Guerin, H. Lortat-Jacob, P. Vieira, F. Baleux, F. Chretien, F. Arenzana-Seisdedos and J. S. Silvestre (2012). "Homeostatic and tissue reparation defaults in mice carrying selective genetic invalidation of CXCL12/proteoglycan interactions." Circulation **126**(15): 1882-1895.

S

Saez de Guinoa, J., L. Barrio, M. Mellado and Y. R. Carrasco (2011). "CXCL13/CXCR5 signaling enhances BCR-triggered B-cell activation by shaping cell dynamics." Blood **118**(6): 1560-1569.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-1164.

Samstag, Y., S. M. Eibert, M. Klemke and G. H. Wabnitz (2003). "Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration." J Leukoc Biol **73**(1): 30-48.

Sancho, D., M. Vicente-Manzanares, M. Mittelbrunn, M. C. Montoya, M. Gordon-Alonso, J. M. Serrador and F. Sanchez-Madrid (2002). "Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions." Immunol Rev **189**: 84-97.

Santori, F. R. (2015). "The immune system as a self-centered network of lymphocytes." Immunol Lett **166**(2): 109-116.

Sasaguri, T., H. Teruya, A. Ishida, T. Abumiya and J. Ogata (2000). "Linkage between alpha(1) adrenergic receptor and the Jak/STAT signaling pathway in vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **268**(1): 25-30.

Schnoor, M., P. Alcaide, M. B. Voisin and J. D. van Buul (2015). "Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation." Mediators Inflamm **2015**: 946509.

Schulz, O., S. I. Hammerschmidt, G. L. Moschovakis and R. Forster (2016). "Chemokines and Chemokine Receptors in Lymphoid Tissue Dynamics." Annu Rev Immunol.

Scimone, M. L., T. W. Felbinger, I. B. Mazo, J. V. Stein, U. H. Von Andrian and W. Weninger (2004). "CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes." J Exp Med **199**(8): 1113-1120.

Serrador, J. M., J. L. Alonso-Lebrero, M. A. del Pozo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, J. Calvo, F. Lozano and F. Sanchez-Madrid (1997). "Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization." J Cell Biol **138**(6): 1409-1423.

Shaffer, M. H., R. S. Dupree, P. Zhu, I. Saotome, R. F. Schmidt, A. I. McClatchey, B. D. Freedman and J. K. Burkhardt (2009). "Ezrin and moesin function together to promote T cell activation." J Immunol **182**(2): 1021-1032.

Sierro, F., C. Biben, L. Martinez-Munoz, M. Mellado, R. M. Ransohoff, M. Li, B. Woehl, H. Leung, J. Groom, M. Batten, R. P. Harvey, A. C. Martinez, C. R. Mackay and F. Mackay (2007). "Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14759-14764.

Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky and M. S. Jordan (2009). "T cell activation." Annu Rev Immunol **27**: 591-619.

Soldevila, G., I. Licona, A. Salgado, M. Ramirez, R. Chavez and E. Garcia-Zepeda (2004). "Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3." Immunology **112**(2): 191-200.

Soriano, S. F., M. Hons, K. Schumann, V. Kumar, T. J. Dennier, R. Lyck, M. Sixt and J. V. Stein (2011). "In vivo analysis of uropod function during physiological T cell trafficking." J Immunol **187**(5): 2356-2364.

Sozzani, S., A. Del Prete, R. Bonecchi and M. Locati (2015). "Chemokines as effector and target molecules in vascular biology." Cardiovasc Res **107**(3): 364-372.

Sprent, J. and C. D. Surh (2011). "Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells." Nat Immunol **12**(6): 478-484.

Stein, J. V., A. Rot, Y. Luo, M. Narasimhaswamy, H. Nakano, M. D. Gunn, A. Matsuzawa, E. J. Quackenbush, M. E. Dorf and U. H. von Andrian (2000). "The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules." J Exp Med **191**(1): 61-76.

Stein, J. V., S. F. Soriano, C. M'Rini, C. Nombela-Arrieta, G. G. de Buitrago, J. M. Rodriguez-Frade, M. Mellado, J. P. Girard and A. C. Martinez (2003). "CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway." Blood **101**(1): 38-44.

Stephens, B. and T. M. Handel (2013). "Chemokine receptor oligomerization and allostery." Prog Mol Biol Transl Sci **115**: 375-420.

Sugiyama, T., H. Kohara, M. Noda and T. Nagasawa (2006). "Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches." Immunity **25**(6): 977-988.

Sumagin, R., H. Prizant, E. Lomakina, R. E. Waugh and I. H. Sarelius (2010). "LFA-1 and Mac-1 define characteristically different intraluminal crawling and emigration patterns for monocytes and neutrophils in situ." J Immunol **185**(11): 7057-7066.

Surova, E. and H. Jumaa (2014). "The role of BCR isotype in B-cell development and activation." Adv Immunol **123**: 101-139.

T

Takada, K. and Y. Takahama (2015). "Positive-selection-inducing self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells." Adv Immunol **125**: 87-110.

Tan, Q., Y. Zhu, J. Li, Z. Chen, G. W. Han, I. Kufareva, T. Li, L. Ma, G. Fenalti, J. Li, W. Zhang, X. Xie, H. Yang, H. Jiang, V. Cherezov, H. Liu, R. C. Stevens, Q. Zhao and B. Wu (2013). "Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex." Science **341**(6152): 1387-1390.

Tashiro, K., H. Tada, R. Heilker, M. Shirozu, T. Nakano and T. Honjo (1993). "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins." Science **261**(5121): 600-603.

Thelen, M. and J. V. Stein (2008). "How chemokines invite leukocytes to dance." Nat Immunol **9**(9): 953-959.

Thomis, D. C., J. Aramburu and L. J. Berg (1999). "The Jak family tyrosine kinase Jak3 is required for IL-2 synthesis by naive/resting CD4⁺ T cells." J Immunol **163**(10): 5411-5417.

Thomis, D. C. and L. J. Berg (1997a). "Peripheral expression of Jak3 is required to maintain T lymphocyte function." J Exp Med **185**(2): 197-206.

Thomis, D. C., W. Lee and L. J. Berg (1997b). "T cells from Jak3-deficient mice have intact TCR signaling, but increased apoptosis." J Immunol **159**(10): 4708-4719.

Tskvitaria-Fuller, I., A. L. Rozelle, H. L. Yin and C. Wulfig (2003). "Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization." J Immunol **171**(5): 2287-2295.

Tybulewicz, V. L. (2005). "Vav-family proteins in T-cell signalling." Curr Opin Immunol **17**(3): 267-274.

U

Ubel, C., S. Mousset, D. Trufa, H. Sirbu and S. Finotto (2013). "Establishing the role of tyrosine kinase 2 in cancer." Oncoimmunology **2**(1): e22840.

Ueda, H., J. Zhou, J. Xie and M. M. Davis (2015). "Distinct Roles of Cytoskeletal Components in Immunological Synapse Formation and Directed Secretion." J Immunol **195**(9): 4117-4125.

Ulvmar, M. H., E. Hub and A. Rot (2011). "Atypical chemokine receptors." Exp Cell Res **317**(5): 556-568.

V

Valitutti, S., M. Dessing, K. Aktories, H. Gallati and A. Lanzavecchia (1995). "Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton." J Exp Med **181**(2): 577-584.

Vardhana, S. and M. Dustin (2008). "Supported Planar Bilayers for the Formation of Study of Immunological Synapses and Kinapse." J Vis Exp(19).

Verstovsek, S., H. Kantarjian, R. A. Mesa, A. D. Pardanani, J. Cortes-Franco, D. A. Thomas, Z. Estrov, J. S. Fridman, E. C. Bradley, S. Erickson-Viitanen, K. Vaddi, R. Levy and A. Tefferi (2010). "Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis." N Engl J Med **363**(12): 1117-1127.

Vestweber, D. (2015). "How leukocytes cross the vascular endothelium." Nat Rev Immunol **15**(11): 692-704.

Vila-Coro, A. J., J. M. Rodriguez-Frade, A. Martin De Ana, M. C. Moreno-Ortiz, A. C. Martinez and M. Mellado (1999). "The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway." FASEB J **13**(13): 1699-1710.

Viola, A., R. L. Contento and B. Molon (2010). "Signaling amplification at the immunological synapse." Curr Top Microbiol Immunol **340**: 109-122.

W

Warnock, R. A., S. Askari, E. C. Butcher and U. H. von Andrian (1998). "Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes." J Exp Med **187**(2): 205-216.

Wei, X., B. J. Tromberg and M. D. Cahalan (1999). "Mapping the sensitivity of T cells with an optical trap: polarity and minimal number of receptors for Ca(2+) signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8471-8476.

Wernimont, S. A., A. J. Wiemer, D. A. Bennin, S. J. Monkley, T. Ludwig, D. R. Critchley and A. Huttenlocher (2011). "Contact-dependent T cell activation and T cell stopping require talin1." J Immunol **187**(12): 6256-6267.

Wilks, A. F. (1989). "Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(5): 1603-1607.

Wilks, A. F., A. G. Harpur, R. R. Kurban, S. J. Ralph, G. Zurcher and A. Ziemiecki (1991). "Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase." Mol Cell Biol **11**(4): 2057-2065.

Wong, M. M. and E. N. Fish (2003). "Chemokines: attractive mediators of the immune response." Semin Immunol **15**(1): 5-14.

Woolf, E., I. Grigorova, A. Sagiv, V. Grabovsky, S. W. Feigelson, Z. Shulman, T. Hartmann, M. Sixt, J. G. Cyster and R. Alon (2007). "Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte

motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces.” Nat Immunol **8**(10): 1076-1085.

Worbs, T., T. R. Mempel, J. Bolter, U. H. von Andrian and R. Forster (2007). “CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo.” J Exp Med **204**(3): 489-495.

Wu, B., E. Y. Chien, C. D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F. C. Bi, D. J. Hamel, P. Kuhn, T. M. Handel, V. Cherezov and R. C. Stevens (2010). “Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists.” Science **330**(6007): 1066-1071.

X

Xu, C., H. Zhao, H. Chen and Q. Yao (2015). “CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting.” Drug Des Devel Ther **9**: 4953-4964.

Y

Yamaoka, K., P. Saharinen, M. Pesu, V. E. Holt, 3rd, O. Silvennoinen and J. J. O’Shea (2004). “The Janus kinases (Jaks).” Genome Biol **5**(12): 253.

Yokosuka, T., W. Kobayashi, K. Sakata-Sogawa, M. Takamatsu, A. Hashimoto-Tane, M. L. Dustin, M. Tokunaga and T. Saito (2008). “Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation.” Immunity **29**(4): 589-601.

Yokosuka, T. and T. Saito (2010). “The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation.” Curr Top Microbiol Immunol **340**: 81-107.

Yoshimura, A. (2005). “Negative regulation of cytokine signaling.” Clin Rev Allergy Immunol **28**(3): 205-220.

Z

Zhang, X. F., J. F. Wang, E. Matczak, J. A. Proper and J. E. Groopman (2001). “Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells.” Blood **97**(11): 3342-3348.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2012). “The chemokine superfamily revisited.” Immunity **36**(5): 705-716.

Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi and D. R. Littman (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-599

XI. Anexo I

Pies de figura de los vídeos

Vídeo 1. Capacidad de movimiento dentro del ganglio de linfocitos T vírgenes con la expresión de JAK1 y JAK2 reducida. Estudio de la velocidad y desplazamiento dentro de un ganglio poplíteo de linfocitos T vírgenes purificados sin nucleofectar (azules), nucleofectados con el ARNip control (verdes) y nucleofectados con los ARNip de JAK1 y JAK2 (rojos).

Vídeo 2. Dinámica de los conjugados formados entre células dendrítica y linfocitos T CD4⁺ sin tratar. Experimento de videomicroscopía en el que se estudia la duración de los contactos que establecen linfocitos T CD4⁺ vírgenes que no han sufrido ningún tratamiento (células pequeñas) con células dendríticas (células grandes). Con una flecha blanca se representa cada contacto entre el linfocito y la célula dendrítica, en este caso la flecha está presente de manera casi constante, indicando que los contactos son de larga duración.

Vídeo 3. Dinámica de los conjugados formados entre células dendrítica y linfocitos T CD4⁺ tratados con AMD3100. Experimento de videomicroscopía en el que se estudia la duración de los contactos que establecen linfocitos T CD4⁺ vírgenes (células pequeñas) que han sido tratados con AMD3100, que bloquea la unión de CXCL12 a su receptor CXCR4, con células dendríticas (células grandes). Con una flecha blanca se representa cada contacto entre el linfocito y la célula dendrítica, viendo como en este caso la flecha es intermitente y por lo tanto los contactos que se establecen son cortos.

Vídeo 4. Dinámica de los conjugados formados entre células dendrítica y linfocitos T CD4⁺ tratados con PTx. Experimento de videomicroscopía en el que se estudia la duración de los contactos que establecen linfocitos T CD4⁺ vírgenes (células pequeñas) que han sido tratados con PTx, que inhibe a la proteína Gi, con células dendríticas (células grandes). Con una flecha blanca se representa cada contacto entre el linfocito y la célula dendrítica, en este caso la flecha aparece y desaparece, lo que significa que los contactos son de corta duración.

Vídeo 5. Estudio de TIRFM de la dinámica de CXCR4-AcGFP (GFP monomérica) en células Jurkat sobre bicapas lipídicas planas artificiales. Experimento de TIRFM sobre bicapas lipídicas que contienen ICAM-1, en células Jurkat electroporadas con la construcción CXCR4-AcGFP. En el vídeo se aprecian en verde las partículas o *spots* detectadas con el software de análisis (U-Track2).

Vídeo 6. Estudio de TIRFM de la dinámica de CXCR4-AcGFP (GFP monomérica) en células Jurkat sobre bicapas lipídicas planas artificiales. Experimento de TIRFM sobre bicapas lipídicas que contienen ICAM-1 y tapizadas con CXCL12 en células Jurkat electroporadas con la construcción CXCR4-AcGFP. En el vídeo se aprecian en verde las partículas o *spots* detectadas con el software de análisis (U-Track2).

Vídeo 7. Estudio de TIRFM de la dinámica de CXCR4-AcGFP (GFP monomérica) en células Jurkat que están formando sinapsis inmunológica sobre bicapas lipídicas planas artificiales. Experimento de TIRFM sobre bicapas lipídicas que contienen ICAM-1 y anti-CD3e que permite la formación de la sinapsis inmunológica y la localización del cSMAC. En el vídeo se aprecian en verde las partículas o *spots* detectadas concentradas alrededor del cSMAC.

Vídeo 8. Estudio de TIRFM de la dinámica de CXCR4-AcGFP (GFP monomérica) en células Jurkat que están formando sinapsis inmunológica en presencia de CXCL12 sobre bicapas lipídicas planas artificiales. Experimento de TIRFM sobre bicapas lipídicas que contienen ICAM-1 y anti-CD3e y que están tapizadas con CXCL12. En el vídeo se aprecian en verde las partículas o *spots* detectadas concentradas alrededor del cSMAC y de mayor intensidad que en el vídeo 6.

Vídeo 9. Dinámica de los conjugados formados entre células dendrítica y linfocitos T CD4⁺ nucleofectados con ARNip control. Experimento de videomicroscopía en el que se estudia la duración de los contactos que establecen linfocitos T CD4⁺ nucleofectados con el ARNip control (células pequeñas) con células dendríticas (células grandes). Con una flecha blanca se representa cada contacto entre el linfocito y la célula dendrítica, en este vídeo la flecha está presente de manera casi constante, indicando una duración larga de los contactos.

Vídeo 10. Dinámica de los conjugados formados entre células dendrítica y linfocitos T CD4⁺ nucleofectados con ARNip de JAK1 y JAK2. Experimento de videomicroscopía en el que se estudia la duración de los contactos que establecen linfocitos T CD4⁺ nucleofectados con el ARNip de JAK1 y JAK2 (células pequeñas) con células dendríticas (células grandes).

Con una flecha blanca se representa cada contacto entre el linfocito y la célula dendrítica, en este caso la flecha es intermitente, indicando una duración corta de los contactos.

XII. Anexo II

Artículos publicados durante el desarrollo de esta Tesis

Publicaciones derivadas de la tesis

1. **CXCL12 Regulates through JAK1 and JAK2 Formation of Productive Immunological Synapses.**
Cascio G, Martín-Cófreces NB, Rodríguez-Frade JM, López-Cotarelo P, Criado G, Pablos JL, Rodríguez-Fernández JL, Sánchez-Madrid F, Mellado M.
 J Immunol. 2015 Jun 1;194(11):5509-19. doi: 10.4049/jimmunol.1402419. Epub 2015 Apr 27.
2. **Janus kinases 1 and 2 regulate chemokine-mediated integrin activation and naïve T-cell homing.**
 Pérez-Rivero G, **Cascio G**, Soriano SF, Sanz ÁG, de Guinoa JS, Rodríguez-Frade JM, Gomariz RP, Holgado BL, Cabañas C, Carrasco YR, Stein JV, Mellado M.
 Eur J Immunol. 2013 Jul;43(7):1745-57. doi: 10.1002/eji.201243178. Epub 2013 May 17.

Otras publicaciones

1. **Chemokine Detection Using Receptors Immobilized on an SPR Sensor Surface.**
 Rodríguez-Frade JM, Martínez-Muñoz L, Villares R, **Cascio G**, Lucas P, Gomariz RP, Mellado M.
 Methods Enzymol. 2016;570:1-18. doi: 10.1016/bs.mie.2015.09.013. Epub 2015 Nov 14.
2. **T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis.**
 Mellado M, Martínez-Muñoz L, **Cascio G**, Lucas P, Pablos JL, Rodríguez-Frade JM.
 Front Immunol. 2015 Jul 27;6:384. doi: 10.3389/fimmu.2015.00384. eCollection 2015. Review.
3. **Suppressor of cytokine signaling 1 blocks mitosis in human melanoma cells.**
 Parrillas V, Martínez-Muñoz L, Holgado BL, Kumar A, **Cascio G**, Lucas P, Rodríguez-Frade JM, Malumbres M, Carrera AC, van Wely KH, Mellado M.
 Cell Mol Life Sci. 2013 Feb;70(3):545-58. doi: 10.1007/s00018-012-1145-8. Epub 2012 Sep 23.

